8432.2
6
2-1

NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
BERLIN

DR. L. LENDLE
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

BOSTON MEDICAL LIBRARY
MAY 1961

219. BAND

MIT 164 TEXTABBILDUNGEN

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1953

Alle Rechte vorbehalten.
Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg.
Printed in Germany.

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH.

Inhalt des 219. Bandes.

Seite

Anderson, H. H., and **G. K. Hurwitz,** Dodecylamine and other agents active against Ascaris lumbricoides and their toxicity in mammals 119

Antonchak, N., s. **R. Gaunt, C. H. Tuthill** and **E. Oppenheimer** 91

Bacq, Z. M., s. **D. Della Bella** 366

Barron, E. S. G., W. P. Sights and **V. Wilder,** The carbohydrate metabolism of heart slices. With 3 figures in the text 338

Begović, S., und **P. Stern,** Das Cardio-Pulmonal-Präparat der Ratte. Mit 2 Textabbildungen 333

Bein, H. J., und **R. Meier,** Zur pharmakologischen Analyse der Blutdrucksteigerung durch Coramin, Histamin und Nicotin bei der narkotisierten Katze. Mit 7 Textabbildungen 273

Bell, F. K., s. **Go Lu, C. J. Carr** and **J. C. Krantz jr.** 115

Bircher, R., s. **E. Rothlin** und **A. Cerletti** 291

Blaschko, H., and **A. D. Welch,** Localization of Adrenaline in Cytoplasmic Particles of the Bovine Adrenal Medulla 17

Bodo, R. C., s. **M. W. Sinkoff** 100

Bonnycastle, D. D., Changes in uterine venous oxygenation during pregnancy in the rabbit. With 2 figures in the text 469

Bornmann, G., und **K. Ritter,** Untersuchungen zur diuretischen Wirkung mehrwertiger Alkohole. Mit 5 Textabbildungen 57

Braunsteiner, H., s. **K. Fellinger, H. Kolder** und **H. Vetter** 440

Brawand, K., s. **W. Wilbrandt** und **P. N. Witt** 397

Brücke, F., F. Kaindl, W. Kobinger, O. Kraupp und **H. Mayer,** Über den Vergleich einer chemischen und biologischen Bestimmungsmethode von Adrenalin und Noradrenalin im Nebennierenvenenblut nach Hypothalamusreizung 169

Carr, C. J., s. **Go Lu, F. K. Bell** and **J. C. Krantz jr.** 115

Cerletti, A., s. **E. Rothlin** und **R. Bircher** 291

Crampton, Ch. F., s. **F. Haurowitz** and **H. H. Reller** 11

Dasgupta, S. R., s. **G. K. Ray, P. K. Roy** and **G. Werner** 310

Deliwala, C. V., s. **O. Krayer, S. M. Kupchan** und **B. H. Rogers** 371

Della Bella, D., et **Z. M. Bacq,** Action de la cystéamine sur le coeur isolé de grenouille et sur l'effet de l'excitation vagale chez la tortue. Evec 4 figures 366

Enders, A., G. Körting und **D. Weiland,** Das Blutbild und die Geschlechtsabhängigkeit bei chronischer Parathionvergiftung. Mit 1 Textabbildung 43

von Euler, U. S., und **B. Folkow,** Einfluß verschiedener afferenter Nervenreize auf die Zusammensetzung des Nebennierenmarkinkretes bei der Katze. Mit 1 Textabbildung 242

Seite

Fellinger, K., H. Braunsteiner, H. Kolder und **H. Vetter,** Nebennierenrinde und Schilddrüsenfunktion. Mit 12 Textabbildungen 440

Filippi, R., s. **E. Pichler** und **W. Lazarini** 420

Fleckenstein, A., und **E. Gerlach,** Papierchromatographische Trennung von Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat und anderen Phosphorverbindungen bei Säugetier- und Tauben-Erythrocyten verschiedenen K^+-Gehalts. (Studien über Blutgifte I.) Mit 7 Textabbildungen 531

Flückiger, E., und **F. Verzár.** Die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin auf die Funktion der Thyreoidea. Mit 4 Textabbildungen 160

Folkow, B., s. **U. S. von Euler** 242

Forst, A. W., und **K. Heuwing,** Eine neue Apparatur zur exakten Registrierung der Frequenz des isolierten Froschherzens mittels Ordinatenschreibung. Mit 2 Textabbildungen 349

Froehlich †, A., Hautveränderungen und Krampfverhütung unter D_2-Hypervitaminose bei jungen Albinoratten. Mit 1 Textabbildung 512

Gaunt, R., C. H. Tuthill, N. Antonchak and **E. Oppenheimer,** Steroids which prevent cortisone from causing atrophy of the adrenal 91

Geiger, E., and **A. N. Wick,** Nitrogen Sparing Effect of Carbohydrate Investigated by Feeding of C^{14} Labeled Glucose 518

Gemmill, Ch. L., The Effect of Cupric Ions on the Absorption Spectrum of Thyroxine. With 2 figures in the text 111

Gerlach, E., s. **A. Fleckenstein** 531

Gigee, W., s. **W. Raab** 248

Gökhan, N., s. **H. Winterstein** 192

Go Lu, F. K. Bell, C. J. Carr and **J. C. Krantz jr.,** Anesthesia XLII. The Oil/Water Coefficient and Water Solubility of Volatile Anesthetics. With 2 figures in the text 115

Gordonoff, T., s. **W. Minder** 485

Gruber, Ch. M., and **R. J. Matthews jr.,** The Effects of Some Sympathomimetic Amines and Cocaine Hydrochloride on the Intact Intestine of the Unanesthetized Dog. With 8 figures in the text 1

Häusler, H. F., Beiträge zur Frage der Herzglykosid-Entgiftung. I. Mitteilung: Digitoxin. Mit 3 Textabbildungen 386

Haurowitz, F., Ch. F. Crampton and **H. H. Reller,** Distribution of antigenic and non-antigenic proteins in the organism. With 1 figure in the text . . 11

Hellauer, H., Zur Charakterisierung der Erregungssubstanz sensibler Nerven. Mit 2 Textabbildungen 234

Herken, H., und **D. Neubert,** Der Acetylcholingehalt des Gehirns bei verschiedenen Funktionszuständen. Mit 3 Textabbildungen 223

Heuwing, K., s. **A. W. Forst** 349

Hess, W. R., Vergleichende physiologische und pharmakologische Untersuchungen der Iris-Muskulatur 284

Holzbauer, M., s. **R. Rigler** 456

Houssay, B. A., and **C. E. Rapela,** Adrenal Secretion of Adrenalin and Noradrenalin 156

Hurwitz, G. K., s. **H. H. Anderson** 119

Jochum, K., s. **O. Schaumann** und **H. Schmidt** 302

Junkmann, K., s. **H. Langecker** und **H. Schümann** 130

Kaindl, F., s. **F. Brücke, W. Kobinger, O. Kraupp** und **H. Mayer** 169

Kapeller-Adler, R., Zur Kenntnis der Histaminase. Mit 1 Textabbildung . . 491

Karczmar, A. G., and **Th. Koppanyi,** Central Effects of Diisopropylfluorophosphonate (D. F. P.) in Urodele Larvae. With 2 figures in the text . . 263

Seite

Keller, R., Elektrische Erscheinungen in endokrinen Organen 502

Kobinger, W., s. **F. Brücke, F. Kaindl, O. Kraupp** und **H. Mayer** 169

Kolder, H., s. **K. Fellinger, H. Braunsteiner** und **H. Vetter** 440

Körting, G., s. **A. Enders** und **D. Weiland** 43

Kopera, H., und **W. Lazarini,** Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse. IV. Mitteilung. Die Verteilung der Substanz P im Zentralnervensystem 214

Koppanyi, Th., s. **A. G. Karczmar** 263

Krantz, jr., J. C., s. **Go Lu, F. K. Bell** and **C. J. Carr** 115

Kraupp, O., s. **F. Brücke, F. Kaindl, W. Kobinger** und **H. Mayer** 169

Krayer, O., S. M. Kupchan, C. V. Deliwala und **B. H. Rogers.** Untersuchungen über die Veratrumalkaloide. XVIII. Die chemischen und pharmakologischen Beziehungen zwischen den Zygadenusalkaloiden und den Veratrumalkaloiden. Mit 7 Textabbildungen 371

Kupchan, S. M., s. **O. Krayer, C. V. Deliwala** und **B. H. Rogers** 371

Landgren, S., G. Liljestrand und **Y. Zottermann,** Wirkung von Alkohol, Aceton, Äther und Chloroform auf die Chemoreceptoren des Glomus caroticum. Mit 6 Textabbildungen 185

Lands, A. M., and **M. L. Tainter,** The Effect of Changes in Molecular Configuration on Inhibitory Sympathomimetic Action. With 1 figure in the text 76

Langecker, H., H. J. Schümann und **K. Junkmann,** Chemische und pharmakologische Eigenschaften des Äthinylcyclohexylcarbaminsäureesters . . 130

Lazarini, W., s. **H. Kopera** 214

— s. **E. Pichler** und **R. Filippi** 420

Lembeck, F., Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse. III. Mitteilung. Das Vorkommen und die Bedeutung der Substanz P in den dorsalen Wurzeln des Rückenmarks. Mit 5 Textabbildungen 197

Lendle, L., H. Mercker und **H. Rohr,** Über die Herzvaguswirkung unter dem Einfluß von Digitalisglykosiden. Mit 3 Textabbildungen 352

Liljestrand, G., s. **S. Landgren** und **Y. Zottermann** 185

Marquardt, P., und **G. Vogg,** Wirkungsunterschiede zwischen dem Acetylester des Cholins und dem des Thiocholins. Mit 5 Textabbildungen 50

Matthews jr., R. J., s. **Ch. M. Gruber** 1

Mayer, H., s. **F. Brücke, F. Kaindl, W. Kobinger** und **O. Kraupp** 169

Meier, R., s. **H. J. Bein** 273

Menkin, V., A Relatively Rapid and Brief Method of Extracting Leukotaxine from Inflammatory Exudates. With 5 figures in the text 473

Mercker, H., s. **L. Lendle** und **H. Rohr** 352

Miestereck, H., s. **H. F. Zipf** 64

Minder, W., und **T. Gordonoff,** Versuche zur Calcium-Proteinbindung im Blutserum. Mit 2 Textabbildungen 485

Neubert, D., s. **H. Herken** 223

Nothman, M. M., Über Harnlipase und ihre Beeinflussung durch Mecholyl und Secretin 528

Oppenheimer, E., s. **R. Gaunt, C. H. Tuthill** and **N. Antonchak** 91

Pichler, E., W. Lazarini und **R. Filippi,** Über schraubenförmige Struktur von Arterien. II. Mitteilung: Pharmakologische Strukturanalyse von Hirnarterien. Mit 6 Textabbildungen 420

Raab, W., und **W. Gigee,** Die Katecholamine des Herzens 248

Rapela, C. E., s. **B. A. Houssay** 156

Seite

Ray, G. K., P. K. Roy, S. R. Dasgupta and **G. Werner,** The action of Rauwolfia Serpentina on Vasomotor Reflexes. With 3 figures in the text . . . 310

Reid, L. C., Effect of thiourea and thyroxine on oxygen uptake of tissue homogenates 466

Reiter, M., Wirkung von Strophanthin auf Kontraktionskraft und Sauerstoffverbrauch des Herzstreifens der Ratte. Mit 8 Textabbildungen . . . 315

Reller, H. H., s. **F. Haurowitz** and **Ch. F. Crampton** 11

Richards, R. K., Zur Pharmakologie quaternärer Procainderivate und ihrer Schutzwirkung gegen Procainkrämpfe, ein Beispiel der Konkurrenzhemmung am Zentralnervensystem. Mit 2 Textabbildungen 35

Rigler, R., und **M. Holzbauer,** Untersuchungen über die wechselseitigen Beziehungen von ACTH zu Intermedin: Kinetik der Intermedinwirkung an der Froschhaut. Mit 5 Textabbildungen 456

Ritter, K., s. **G. Bornmann** 57

Rogers, B. H., s. **O. Krayer, S. M. Kupchan** und **C. V. Deliwala** 371

Rohr, H., s. **L. Lendle** und **H. Mercker** 352

Rothlin, E., A. Cerletti und **R. Bircher,** Experimentelle Untersuchungen über die Beeinflussung renaler Ischämien durch Hydergin. Mit 6 Textabbildungen 291

Roy, P. K., s. **G. K. Ray, S. R. Dasgupta** and **G. Werner** 310

Schaumann, O., K. Jochum und **H. Schmidt,** Analgetika und Darmmotorik. III. Zum Mechanismus der Peristaltik. Mit 5 Textabbildungen 302

Scherf, D., Auricular flutter and fibrillation originating in the atrioventricular node. With 3 figures in the text 30

Schmidt, H., s. **O. Schaumann** und **K. Jochum** 302

Schümann, H. J., s. **H. Langecker** und **K. Junkmann** 130

Sights, W. P., s. **E. S. G. Barron** and **V. Wilder** 338

Sinkoff, M. W., and **R. C. Bodo,** Prolactin as an Insulin Antagonist. With 4 figures in the text 100

Stern, P., s. **S. Begović** 333

Tainter, M. L., s. **A. M. Lands** 76

Tuthill. C. H., s. **R. Gaunt, N. Antonchak** and **E. Oppenheimer** 91

Umrath, K., Der fermentative Abbau der Erregungssubstanz der sensiblen Nerven, seine p_H-Abhängigkeit und seine Hemmung durch zentral erregende Stoffe 148

Verzár, F., s. **E. Flückiger** 160

Vetter, H., s. **K. Fellinger, H. Braunsteiner** und **H. Kolder** 440

Vogg, G., s. **P. Marquardt** 50

Vogt, W., Zum Einfluß biogener Stoffe auf die Darmmotilität. Mit 1 Textabbildung 138

Wasicky, R., Die digitalisartige Wirkung von Crinum pratense Herb. und Hippeastrum solandriflorum Herb. 362

Weiland, D., s. **A. Enders** und **G. Körting** 43

Welch, A. D., s. **H. Blaschko** 17

Welsh, J. H., Excitation of the Heart of Venus mercenaria. With 4 figures in the text 23

Werner, G., s. **G. K. Ray, P. K. Roy** and **S. R. Dasgupta** 310

Wiek, A. N., s. **E. Geiger** 518

Wilbrandt, W., K. Brawand und **P. N. Witt,** Die quantitative Abhängigkeit der Strophantosidwirkung auf das Froschherz von der Tätigkeit des Herzens und von der Glykosidkonzentration. Mit 7 Textabbildungen . . 397

Seite

Wilder, V., s. **E. S. G. Barron** and **W. P. Sights** 338

Winterstein, H., und **N. Gökhan,** Chemoreceptoren-Reizstoffe und Blut/Hirn-Schranke 192

Witt, P. N., s. **W. Wilbrandt** und **K. Brawand** 397

Wollenberger, A., Metabolic Action of the Cardiac Glycosides III. Influence of Quabain on the Utilization of C^{14}-Labeled Glucose, Lactate, and Pyruvate by Dog Heart Slices 408

Zipf, H. F., und **H. Miestereck,** Digitalisstoffe und Impulsaussendung des Herzens. Mit 3 Textabbildungen 64

Zottermann, Y., s. **S. Landgren** und **G. Liljestrand** 185

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 1—10 (1953).

Department of Pharmacology, Jefferson Medical College, Philadelphia, Pa.

The Effects of Some Sympathomimetic Amines and Cocaine Hydrochloride on the Intact Intestine of the Unanesthetized Dog*.

By

CHARLES M. GRUBER and RICHARD J. MATTHEWS, jr.**.

With 8 figures in the text.

(Eingegangen am 31. Januar 1953.)

Numerous studies have been made on the effects of adrenalin chloride upon excised and intact intestine but as far as we have been able to determine no one has investigated the effects of the pure crystalline L-and D-isomers of epinephrine on the intact intestine of the uanaesthetized dog. Although the effects of a number of sympathomimetic drugs other than tyramine acid phosphate, amphetamine sulfate, and ephedrine sulfate[25] upon the intact intestine have been studied, the question as to what effect injections of cocaine hydrochloride administered before the injections of these drugs will have upon the responses to these sympathomimetic amines is still unexplored. In this work these problems are considered.

Sensitization of the sympathetic nerve endings to epinephrine by an injection of cocaine was demonstrated in 1910 by FRÖHLICH and LOEWI[9], who performed their experiments upon cats and rabbits, using the vascular system, pupil and urinary bladder as the test organs. The results they obtained have been confirmed and extended to include the effects with ephedrine and tyramine[3, 5, 6, 7, 8, 19, 22, 23]. Most of the later investigators who repeated and amplified this earlier work concluded that epinephrine was a sympathomimetic drug and that tyramine and ephedrine were musculotropic amines. However, BURN[4] by further investigation came to a different conclusion, that epinephrine acts upon the neuromuscular junction, while ephedrine and tyramine act upon the sympathetic nerve endings.

The effect that cocaine has upon the responses of excised small intestine to epinephrine, tyramine and ephedrine has been a popular subject of investigation[5, 11, 12, 14, 17, 21, 24]. The many results, because of variability, fail to support the conclusions of the experimenters who worked with the vascular system.

The subject of what effect, if any, an injection of cocaine has upon the effects of these drugs in the intact intestine of the non-anesthetized dog was presented by GRUBER[10]. He observed that when cocaine was injected intravenously in 3 to 8 mg/kg doses it caused variable results in the intact intestine. In some experiments it increased the general tonus and in others it decreased it. There appeared to be no

* In honor of Dr. OTTO LOEWI on his 80th birthday.

** This work was done in partial fullfilment for the Ph. D. degree in Pharmacology in the Graduate School at Jefferson Medical College.

relationship between dose and effect. In the series which he performed, the fact that cocaine had been injected before the injections of adrenalin chloride failed to influence the results in eight experiments; in four cocaine increased the sensitivity of the sympathetic system to epinephrine; it completely abolished the action of tyramine and ephedrine in 10 experiments each and markedly diminished the action of these drugs in two experiments each. Upon the basis of Burns conclusions Gruber believed that cocaine paralyzes the sympathetic nerve endings upon which tyramine and ephedrine act, leaving intact the neuromuscular junction, upon which epinephrine acts.

The effect of dl-amphetamine sulfate and its L and D isomers on the propulsive motility of the intact small intestine of unanesthetized rats and dogs was studied by van Liere and his associates[13]. They noted that the speed at which charcoal traveled in the intestine after the administration of any of these isomers was slower than before and they therefore concluded that the propulsive motility of the small intestine was decreased by these drugs.

Method.

Our experiments were performed on three dogs in which modified Mann loops of the small intestine had been made, the necessary operative procedures having been carried out under surgical ether anesthesia and time having been allowed for complete healing of the wounds before any experimentation was begun. The loops were prepared by sectioning the intestine at the desired level and bringing the cut end of the caudal portion of the gut to the outside, through a stab wound through the anterior abdominal wall. The cephalic end of the gut was closed with a pursestring suture, the section drawn down and connected by means of a side-to-side anastomosis with a large stoma to the caudal section of the intestine about 15 to 20 cm below its opening to the outside of the abdomen. A loop made in this way is preferable to a Thiry-Vella loop because in the latter preparation the section of the intestine becomes inactive and unresponsive to drugs in the course of a few months while this type endures for the life of the animal. With a modified Mann intestinal loop the balloon can be inserted sufficiently far into the intestine to lie, if necessary, in the normally functioning section of the gut*.

Our dogs were trained to submit to experimentation without anesthetics. A rubber balloon was inserted into the lumen of the gut and connected to a pressure bottle containing water. This bottle was connected to a modified Brodie bellows to record the changes in the activity and tonus on a smoked kymograph drum surface. The pressure in the balloon was 15 cm of water in each experiment. After sufficient time had elapsed for the intestine to become adjusted to the presence of the balloon, as indicated by a more or less smooth record, freshly prepared solutions of the drugs were injected into either the *saphena parva* vein or the lateral ear vein. Usually an animal was permitted to rest for one week after each experiment. The members of the L-series of epinephrine were injected in dilutions of 1:1000 and those of the D-series in dilutions of 1:1000 and 1:100.

Results.

L-epinephrine and *L-nor-epinephrine* A 1:1000 solution of L-epinephrine bitartrate was injected in doses of 0.14 cc and 0.2 cc, five and fourteen times respectively (fig. 1 and 2 at 1). These injections caused a temporary inhibition of the contractions and a decrease in the general

* See H. Bettel, this journal **175**, 390/391, 1934 (added by W. Heubner).

tonus eleven times (fig. 1, at 1) and a temporary decrease in the general tonus and complete stoppage of the rhythmical contractions followed by a marked increase in the general tonus eight times (fig. 2, at 1). L-nor-epinephrine bitartrate was injected only once in a dose of 0.14 cc and seven times in 0.2 cc doses. These results were similar to those obtained with the use of L-epinephrine. In four instances a decrease in the general tonus and complete cessation of the rhythmical contractions occurred

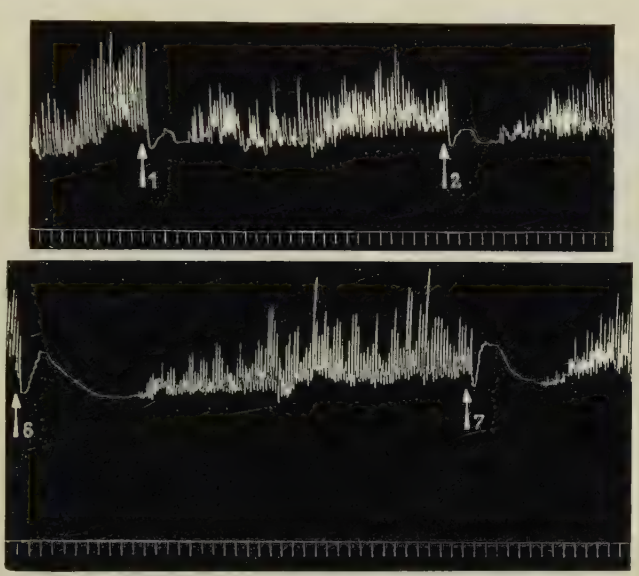


Fig. 1. Dog ♀ 17 kg. In this and in all of the following figures the top record is that of the contractions of the intestine recorded by means of a balloon placed within its lumen. The balloon was connected to a modified Brodie bellows and the pressure within the balloon was kept at 15 cm water pressure. Below this is the time in intervals of 20 seconds. Up stroke in the muscle lever is contraction and increase in tonus and down stroke that of relaxation and decrease in general tonus. — 1. L-epinephrine bitartrate 0.2 cc 1:1000 solution, 2. L-nor-epinephrine bitartrate 0.2 cc (1:1000), 6. L-nor-epinephrine bitartrate 0.2 cc (1:1000), 7. L-epinephrine bitartrate 0.2 cc (1:1000). — Before curves 6 and 7 were made, 50 mg of cocaine hydrochloride were injected intravenously.

(fig. 1, at 2) and in an equal number of experiments a similar effect followed by both an increase in tone and in rhythmical contractions was noted (fig. 2, at 2).

D-epinephrine and *D-nor-epinephrine* After three injections of the D-series (1:1000 dilution) it was learned that these isomers were less than one-tenth as active on the intact intestine, as those of the L-series, and D-nor-epinephrine was found even less active than the D-epinephrine (fig. 3, at 2). The only result following any of these injections (1:1000) was an insignificant or questionable effect on the tone of the intestine. In dilutions of 1:100, D-epinephrine bitartrate was injected in 0.14 cc doses eleven times and in a 0.5 cc dose once. In these an

inhibition of the contractions and a decrease in the general tonus was observed four times and similar changes followed by an increase in the general tonus and rhythmical contractions were seen eight times (fig. 3, at 1 and 3). D-nor-epinephrine bitartrate in 1:100 dilution was injected in doses of 0.14 cc five times and from these, there was seen a temporary cessation of the rhythmical contraction accompanied by a

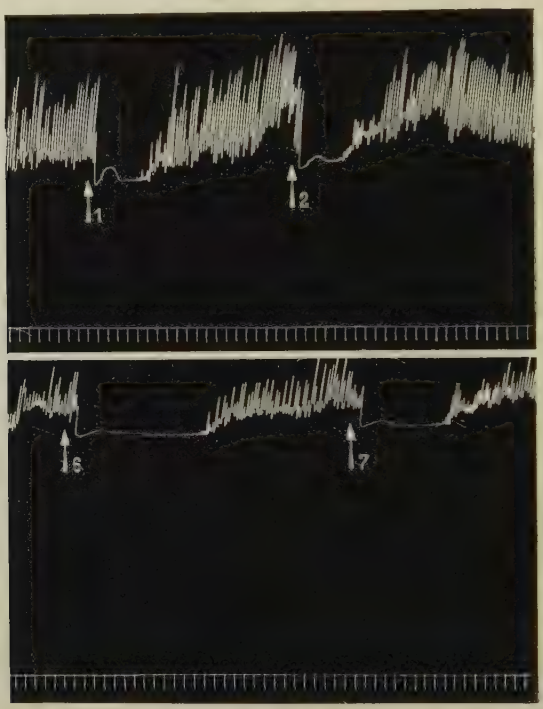


Fig. 2. Dog ♀ 16 kg. 1. L-epinephrine bitartrate 0.2 cc 1:1000 solution, 2. L-nor-epinephrine bitartrate 0.2 cc (1:1000), 6. L-nor-epinephrine bitartrate 0.2 cc (1:1000), 7. L-epinephrine bitartrate 0.2 cc (1:1000). — During the interval between 2 and 6,5 mg/kg of cocaine hydrochloride were injected intravenously.

decreased general tonus once and similar changes followed by an increase in the general tonus and rhythmical contractions three times. In one experiment there was probably no change (fig. 3, at 2). In the four experiments in which positive results were observed they were similar, though less distinct than the results seen with D-epinephrine in figure 3, at 1 and 3. Adrenalin chloride was injcted intravenously five times in doses of 0.1 cc of a 1:1000 solution. The results here observed confirm the findings of Gruber[10] and are similar to those noted with the use of the L-series of epinephrine.

Cocaine Hydrochloride Cocaine hydrochloride was injected in doses of 3 and 5 mg/kg. Our results on these three animals with the use of cocaine confirm the findings of GRUBER[10]. In some instances it increased the general tonus of the gut and in other instances it decreased it. The results varied not only from animal to animal but also in the same animal from day to day.

Following the injection of cocaine, L-epinephrine bitartrate was injected eight times and L-nor-epinephrine was injected nine times. In the majority of instances the response of the intestine was potentiated by

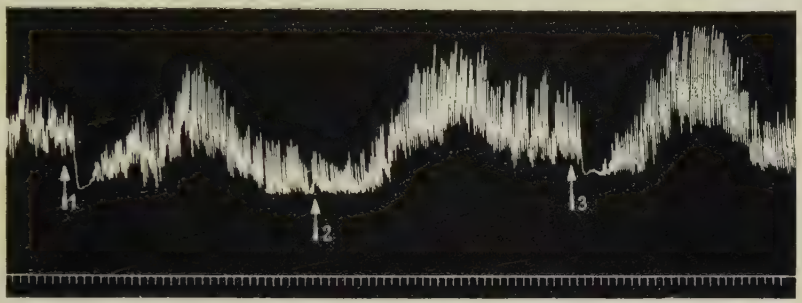


Fig. 3. Dog ♀ 20 kg. 1. D-epinephrine bitartrate 0.14 cc, 1:100 solution, 2. D-nor-epinephrine bitartrate 0.14 cc (1:100), 3. D-epinephrine bitartrate 0.14 cc (1:100).

the cocaine as seen in fig. 1 and 2, at 6 and 7. In these experiments the drug first used after the injection of cocaine always seemed to be the more active. In the figures presented the L-nor-epinephrine was injected first (fig. 1 and 2, at 6) and it appears to be much stronger than the L-epinephrine (figs. 1 and 2, at 7). However, in those experiments in which L-epinephrine was administered first it also appeared to be the stronger. These two compounds seem equally potentiated by cocaine. The cause of the variation between the first and second injections is probably due to the fact that as the cocaine is being destroyed in the body it has become less effetive at the time of the injection of the second drug.

In the D-series of epinephrine if cocaine had any effect it was one of depression rather than potentiation (fig. 3 and 4). In fig. 3, at 1 and at 3, 0,14 cc of a 1:100 solution of D-epinephrine bitartrate was injected intravenously. Although the effects are less striking than the results with the L-series (fig. 1 and 2) a definite effect upon the gut can be seen. In this figure, at 2, an equal amount of D-nor-epinephrine bitartrate was injected similarly with doubtful results. However, if potentiation were a result obtained with cocaine this latter effect then should now be changed to a positive effect. After 5 mg/kg of cocaine hydrochloride was administered intravenously fig. 4 was made. At 5 and again at 6, doses of D-nor-epinephrine equal to those given in fig. 3, at 2, were

injected without positive effects. At 7, 0.3 cc of a 1:100 dilution was injected with no visible potentation. In all, seven injections each of D-epinephrine and D-nor-epinephrine were made in the three dogs follo-

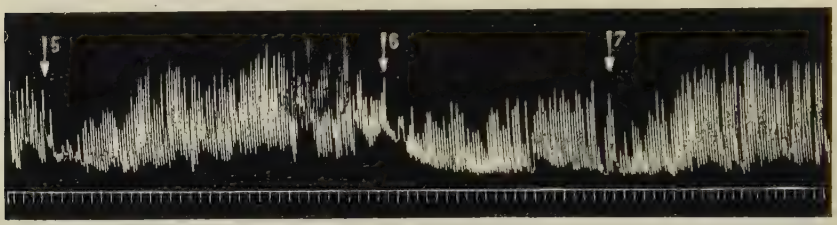


Fig. 4. Continuation of figure 3. Before this record was made 100 mg of cocaine hydrochloride were injected intravenously. — 5. D-nor-epinephrine bitartrate 0.14 cc, 1:100 solution, 6. D-nor-epinephrine bitartrate 0.14 cc (1:100), 7. D-nor-epinephrine bitartrate 0.3 cc (1:100).

wing doses of cocaine. With the D-epinephrine five experiments showed either no change or a possible slight decrease in the action and two showed a definite decrease in action. After cocaine doses of 0.14 cc of a 1:100 solution of D-nor-epinephrine were administered five times and 0.3 cc

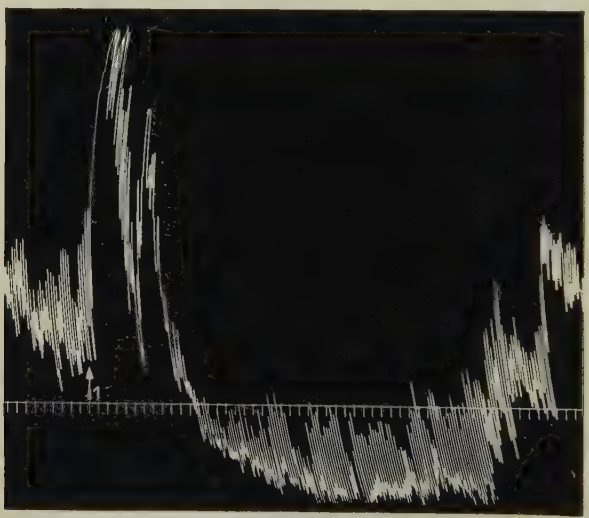


Fig. 5. Same animal as that used in figure 3. — 1. D-l-isopropylarterenol hydrochloride (Isuprel) 0.1 cc, 1:1000 solution.

twice. The smaller dose produced in one case no visible change; in one a possible decrease, and a third a marked decrease in the responses; in the remaining instances the gut did not respond at all to the amine. The results with the larger doses were also variable.

*D-L-isopropylarterenol Hydrochloride (Isuprel)** Isuprel was injected intravenously in doses of 0.1 cc of a 1:1000 solution twenty-seven times and in 0.2 cc doses three times. A marked rise followed by a prolonged decrease in tonus was observed following twenty-six such injections (fig. 5, at 1). In two of the experiments with the smaller dose, an increase, then a decrease and again an increase in tonus were noted similar to that seen in fig. 7 at 7. A questionable increase in the general tonus was seen in the remaining two experiments which gave results like that seen in fig. 6, at 1. Four injections were made with the 1:10000 dilution and

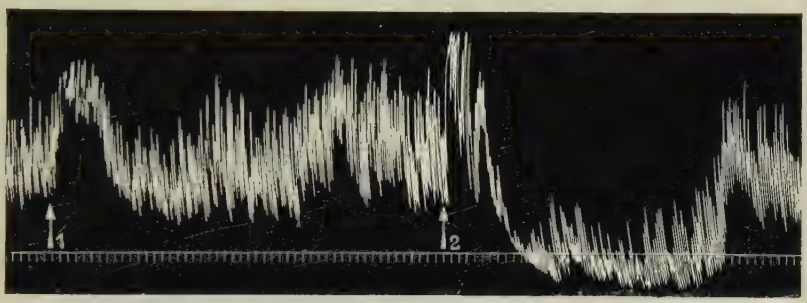


Fig. 6. Same animal as that used in figure 3. — 1. D-l-isopropylarterenol hydrochloride 0.1 cc, 1:10,000 solution, 2. D-l-isopropylarterenol hydrochloride 0.1 cc (1:1000).

only one with the 1:100000 dilution all with variable responses. In two instances there was a pure rise in the general tonus as seen in fig. 6, at 1, in one a rise followed by a fall and in one with the stronger solution and one with the weaker solution the results were doubtful.

Cocaine definitely depresses the effects of Isuprel. Fourteen injections of the latter were made following the intravenous injection of cocaine hydrochloride and uniformly produced a decrease in the response of the gut to Isuprel as compared with results obtained with Isuprel alone. This can best be seen by comparing the results in fig. 6 and 7. In fig. 6, at 1, 0.1 cc of a 1:10000 solution of Isuprel was injected intravenously and a rise in the general tonus is seen. At 2 in this figure, 0.1 cc of 1:1000 solution was injected which produced a temporary rise followed by a prolonged decrease in the general tonus. Three milligrams per kg. of cocaine hydrochloride were now injected intravenously into the animal. After a wait of about five minutes, 0.1 cc of a 1:10000 solution of Isuprel (same dose as was given fig. 6, at 1) was injected intravenously without effect (fig. 7, at 4). At 5, in this figure the dose of Isuprel injected was the same as that which had been used in fig. 6, at 2, before the injection of cocaine. As can be seen only an increase in the general

* German brand of the sulfate = „Aludrin" (added by W. Heubner).

tonus was produced. To show that the gut was still sensitive to other sympathomimetic amines, 0.1 cc of a 1:1000 solution of adrenalin chloride was injected at 6 producing the expected response, inhibition. After the gut had recovered from the effects of the adrenalin, 0.1 cc of a 1:1000 solution of Isuprel was again injected (at 7) and it induced a response similar to the one seen before injection of cocaine. In this instance the general tonus was first increased, followed by the usual decrease and again by a marked increase which lasted for many minutes.

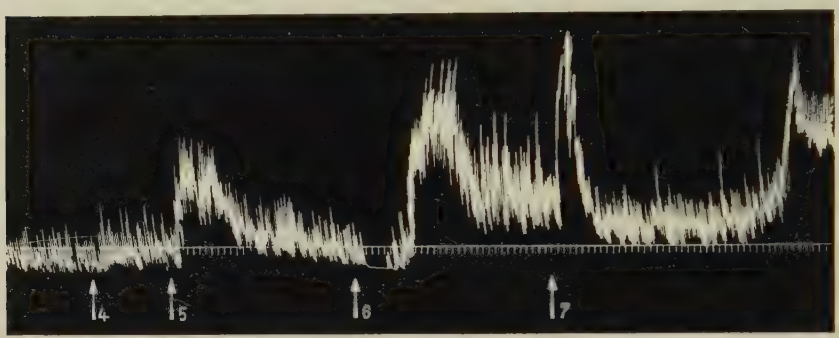


Fig. 7. Continuation of figure 6, but taken after the injection of 50 mg of cocaine hydrochloride. 4. D-l-isopropylarterenol hydrochloride 0.1 cc of a 1:10,000 solution, 5. D-l-isopropylarterenol hydrochloride 0.1 cc (1:1000 solution), 6. Adrenalin chloride 0.1 cc (1:1000 solution), 7. D-l-isopropylarterenol hydrochloride 0.1 cc (1:1000 solution).

That the decrease in the response of the gut to D-epinephrine, D-norepinephrine and Isuprel after the injection of cocaine is not due to tolerance but rather to the cocaine was demonstrated by the fact that repeated injections of these drugs in the normal animal brought about the same degree of response of the intestine to the drug on the fifth injection as it had on the first injection.

Amphetamine Sulfate Benzedrine sulfate was injected in 1, 2 and 3 mg doses five times with questionable results. In fig. 8, at 2, 3 mg of Amphetamine sulfate in 0.3 cc of distilled water were injected intravenously. This dose caused slight excitment in the dog but no apparent change in the intestine. To show that the intestine was active to sympathomimetic compounds 0.1 cc of 1:1000 solution of adrenalin chloride was injected intravenously, at 3, with the usual results.

Phenylephrine hydrochloride (Neo-Synephrine)*. Phenylephrine hydrochloride was injected in doses of 0.1 cc of 1:100 solution seven times before and an equal number of times after injections of cocaine hydrochloride. Those injections of phenylephrine made before the injection of cocaine were followed by a temporary inhibition of the contractions

* 1-meta-Hydroxyphenyl-2-methylamino-ethanol hydrochloride.

and general tonus, the longest inhibitory effect lasting a little over one minute. The same dose of phenylephrine injected after cocaine had been administered caused no change in the intact intestine in three cases — no change over its effect before cocaine once, and an increase in its inhibitory effect twice. In one experiment in which 0.1 cc of a 1:100 dilution of phenylephrine had no effect in the presence of cocaine another dose of 0.2 cc was injected but as before no effect on the intestine was

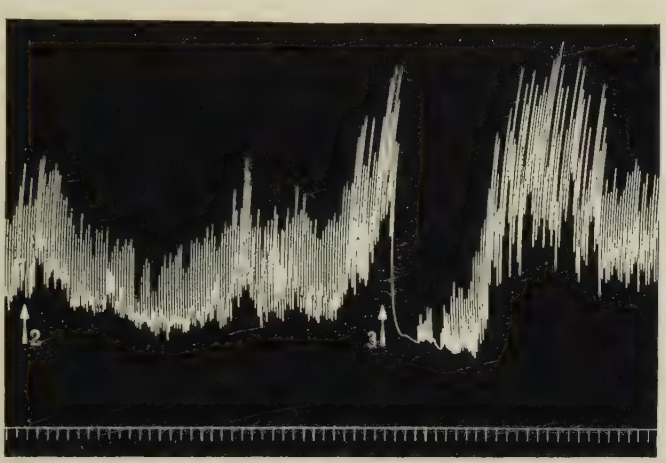


Fig. 8. Dog ♀ 17 kg. 2. Amphetamine sulfate 3 mg., 3. Adrenalin chloride 0.1 cc (1:1000 solution)

observable. Epinine, like phenylephrine, relaxed the gut when injected intravenously in adequate doses but showed variable effects on the intestine when given after cocaine.

The role that anemia plays in these results is not yet known but, after comparing our results with those of previous investigators we are inclined to believe its part is of little importance. SCHIFF[20] induced anemia by obstruction of the aorta and reported increased intestinal activity. NASSE[18] and MAYER and VON BASCH[16] state that obstruction of the aorta arrested the intestinal movements for a time, but they returned with increased vigor. BETZ[1], VAN BRAAM-HOUCKGEEST[2] and MALL[15] report that anemia only inhibits all movements of the intestine.

Summary.

All except one of the pure crystalline sympathomimetic amines, L-epinephrine bitartrate; L-nor-epinephrine bitartrate; D-epinephrine bitartrate; D-nor-epinephrine bitartrate; L-D-isopropylarterol hydrochloride (Isuprel); amphetamine sulfate (Benzedrine sulfate); phenylephrine hydrochloride (Neo-Synephrine) and Epinine* used, when given

* We wish to thank Dr. M. L. TAINTER and Dr. BARNARD THOMPSON of Sterling-Winthrop Research Institute and Parke-Davis and Co. respectively for the generous supply of the sympathomimetic amines used in this research.

in adequate dosage, caused an inhibition of the contractions of the intestine with a decrease in its general tonus. The only exception is, D-l-isopropylarterenol hydrochloride (Isuprel). This amine caused an increase in the general tonus with small doses and an increase followed by a decrease in the general tonus with large doses. The L-epinephrine series was found to be at least ten times as potent on the intestine as the D-epinephrine series. Cocaine administered before injections of L-epinephrine or L-nor-epinephrine definitely potentiates the effects of these latter drugs. It has a variable influence upon the effects of phenylephrine hydrochloride and Epinine and decreases the responses of the gut to all of the other sympathomimetic amines studied.

References.

[1] Betz, F.: Z. f. rat. med., R. II, **1**, 329 (1851). — [2] Van Braam-Houckgeest, J. P.: Arch. f. Physiol. **6**, 292 (1872); **8**, 163 (1874). — [3] Burn, J. H.: Quart. J. Pharmacol., London, **3**, 187 (1930). — [4] Burn, J. H.: J. of Pharmacol. **46**, 75 (1932). — [5] Burn, J. H., and M. L. Tainter: J. of Physiol **71**, 169 (1931). — [6] Chen, K. K.: J. of Pharmacol. **33**, 216 (1928). — [7] De Eds, F.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **24**, 551 (1927). — [8] De Eds, F., and E. M. Butt: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **24**, 800 (1927). — [9] Fröhlich, A., and O. Loewi: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **62**, 159 (1910). — [10] Gruber, C. M.: J. of Pharmacol. **57**, 347 (1936). — [11] Kreitmair, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **120**, 189 (1927). — [12] Kuroda, M.: J. of Pharmacol. **7**, 423 (1915). — [13] Van Liere, E. J., J. C. Stickney, D. W. Northup and R. O. Bell: J. of Pharmacol. **103**, 187 (1951). — [14] Lindblom, C. O.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **95**, 1070 (1926). — [15] Mall, F. P.: John Hopkins Hosp. Rep. **1**, 37 (1896). — [16] Mayer, S., and S. von Basch: Wein. Sitzungsber. **62**, 811 (1870). — [17] Nagel, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **110**, 128 (1925). — [18] Nasse, O.: Phys. d. Darmbewegungen, 1 p. 1, 70 pp. Leipzig 1866. — [19] Pak, C. Y., and B. E. Read: Chin. J. Physiol. **2**, 1 (1928). — [20] Schiff, J. M.: Lehrb. d. Physiol. 1858, p. 105. — [21] Seidenfeld, M. A., and M. L. Tainter: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **28**, 612 (1925). — [22] Tainter, M. L.: J. of Pharmacol. **36**, 569 (1929). — [23] Tainter, M. L., and D. K. Chang: J. of Pharmacol. **30**, 193 (1927). — [24] Thienes, C. H., A. J. Hockett, P. Palek and L. Shutter: Arch. internat. Pharmacodynamie **47**, 453 (1934). — [25] Youmans, W. B., K. W. Aumann and H. F. Haney: Amer. J. Physiol. **126**, 237 (1939).

Charles M. Gruber, M. D.,
Jefferson Medical College, 1025 Walnut Street, Philadelphia, Pa., USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 11—16 (1953).

Department of Chemistry, Indiana University, Bloomington, Indiana.

Distribution of antigenic and non-antigenic proteins in the organism*.

By

Felix Haurowitz, Charles F. Crampton and Herbert H. Reller.

With 1 figure in the text.

(Eingegangen am 13. Januar 1953.)

Recently in these laboratories it has been found that iodoproteins as well as azoproteins, when intravenously injected into rabbits, are rapidly deposited in the cytoplasmic granules of liver and spleen, and probably of other organs also[1, 2]. It was concluded from these experiments that the cytoplasmic granules are involved in the formation of antibodies. If this conclusion is right, one should expect (I) that other types of antigens would also be bound to the cytoplasmic granules, and (II) that nonantigenic proteins would not necessarily be accumulated in the granules. Both of these premises were investigated and the results are presented in this paper.

Experimental.

Antigens Crystalline ovalbumin from hens' eggs, bovine serum γ-globulin and rabbit serum γ-globulin were labeled by traces of I^{131}, using the method of Warren and Dixon[3]. The total iodine content of these trace-labeled proteins was determined as previously described[1]; it varied from 0,4 to 0,5%, corresponding to approximately 3—4 iodine atoms per 10^5 gram protein.

Immunisation, Isolation of Proteins, and Analysis. Each of the rabbits received a single intravenous injection of the antigen. The amounts of antigen injected, the weight of the animals, and the time of sacrifice are recorded in Table 1. The preparation of the organ proteins, and of the proteins of the nuclear, mitochondrial, microsomal, and supernatant fractions isolated from homogenates of liver and spleen, are described in a previous communication[1].

Discussion of Results.

The antigens used in these experiments differ from the iodoproteins used in previous experiments[1] by their much lower iodine content. Serologically they behave like unsubstituted ovalbumin, beef serum γ-globulin and rabbit serum γ-globulin. While the injection of the heavily substituted iodoproteins induces the formation of antibodies

* Dedicated to Professor Otto Loewi on the occasion of his 80th birthday.

which combine specifically with the iodotyrosine group, the injection of slightly labeled ovalbumin or beef serum γ-globulin elicits the formation of antibodies which combine only with the slightly labeled ovalbumin and beef serum γ-globulin or their unlabeled counterparts, not with the iodotyrosine groups of the heavily substituted iodoproteins[4].

Other investigators have[4–7] already shown that slightly labeled beef serum albumin or globulin are eliminated from the blood slowly, with the concentration of the antigens being higher in the blood than in any of the organs, thus differing widely from the heavily substituted iodoproteins and azoproteins which disappear from the blood rapidly and are found in the organs in higher concentration than in the blood. The beef serum proteins, during the first days after injection, behave like trace-labeled rabbit serum globulin when injected into rabbits[4, 5]. In contrast to the non-antigenic rabbit serum globulin, however, the antigenic beef serum proteins are eliminated from the rabbit blood as soon as sufficient amounts of antibody appear in the blood, that is about 4—7 days after injection of the antigen[4–8].

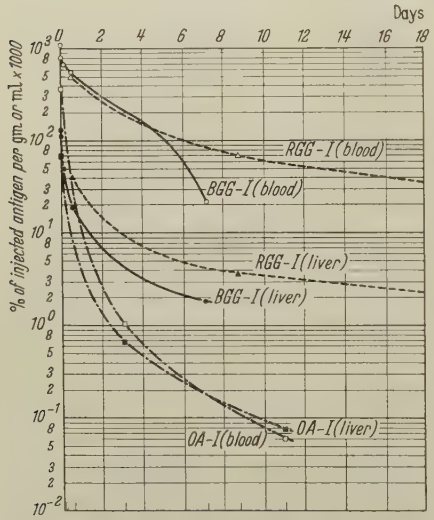


Fig. 1. Activities found in blood and liver after intravenous injection of the antigens. *RGG* Rabbit serum γ-globulin; *BGG* Beef serum γ-globulin; *OA* Ovalbumin.

Our own results with trace-labeled beef serum γ-globulin and rabbit serum γ-globulin are in accordance with the results obtained by the others. Figure 1 shows that the injected rabbit serum globulin disappears very slowly from the blood; if we assume that the average blood content of a rabbit is approximetaly 6% of the body weight, we find that the blood of rabbit no. 138, 8.8 days after injection, contains $1840 \times 6 \times 70/100 \times 1000 = 7.7\%$, of the injected protein. At all times, the antigen concentration in the organs is lower than that of the blood. The same is true for the antigen content of the organs after injection of the antigenic beef serum γ-globulin; however, here we find only 3,5% of the injected antigen in the blood, 7.2 days after injection.

While all these findings parallel those of other authors, there is a difference in the behavior of the trace-labeled ovalbumin. It had been found already by Dixon and Warren[9] that egg albumin labeled by I^{131} is lost from the blood of guinea-pigs more rapidly than beef serum globulin; this was attributed to the rapid renal excretion of the small ovalbumin molecule. Indeed, Fig. 1 shows a rapid drop of the antigen

content of the blood from 64.5% of the injected antigen, 12 minutes after injection, to 0.14% after 3 days, and to 0.009% after 11 days. While this is in agreement with the assumption of rapid renal excretion, the antigen content of the organs, 11 days after injection, is higher than that of the blood. This proves that the antigen content of the organs is not due to the equilibration with the blood, but to true deposition. The question arises whether beeef serum γ-globulin is deposited in the organs a similar fashion. Owing to the slow disappearance of beef serum γ-globulin from the blood, and to the contamination of the organs by blood, it seemed difficult to decide whether true deposition of the beef serum γ-globulin occurs; one would have to wait until the antigen level of the blood is as low as that of the injected ovalbumin on the 11th day after injection; the short halflife of I^{131} is not favorable for such experiments.

True deposition of both ovalbumin and beef serum γ-globulin in rabbit organs is indicated, however, by analysis of the subcellular fractions. In the lower portion of the Table the radioactivity of the proteins of whole liver or spleen homogenate has been set equal to 1.0, so that values considerably higher than 1.0 in the proteins of a particulate fraction (nuclear, mitochondrial or microsomal) indicate deposition of the antigen, while high values in the proteins of the supernatant cellular fluid may be due to equilibration with blood plasma of high antigen content. In evaluating the relative activities recorded in the Table, we have to take into account the fact that before homogenization the livers were perfused with sucrose solution, while the spleens were not perfused, and were, therefore, contaminated by blood. It is clear from Table I that the deposition of antigen in cytoplasmic granules is not restricted to heavily substituted iodo- or azoproteins, but that it is also observed for slightly labeled ovalbumin or beef serum globulin and even for the homologous rabbit serum globulin injected into rabbits.

The slightly labeled ovalbumin behaves exactly like iodoovalbumin which contains 8—10% iodine; it is immediately deposited in the cytoplasmic granules of liver and spleen (rabbit 149 and 142). Beef and rabbit serum γ-globulin, in contrast to ovalbumin, are slowly removed from the rabbits blood. Their initial deposition in the cytoplasmic granules, indicated by high relative activities of the mitochondrial and microsomal fractions, is followed by a period in which the injected protein is found in almost equal concentration in the proteins of all four fractions of the cellular homogenate. During this period the cells are exposed to the high concentration of the injected protein in blood and lymph. The even distribution of the injected antigen in the proteins of nuclei, large and small granules, and cell sap, indicates non-specific

Table. *Distribution of trace-labeled proteins in organs and subcellular fractions.*

Rabbit:												
no.:	149	142	147	118	117	119	102	105	139	99	138	127
weight (in kg):	2.19	2.33	2.48	1.66	1.74	1.86	2.12	2.62	2.23	2.10	1.84	2.35
Injected antigen:												
type	Ovalbumin (I^{131})			Beef serum γ-globulin (I^{131})					Rabbit serum γ-globulin (I^{131})			
mg. per kg.	30	30	30	30	30	30	30	30	15	30	15	15
counts/min. $\times 10^{-6}$ =	0.44	3.5[2]	7.0[2]	1.54	3.54	1.06	0.38	6.51	19.2	1.81	7.6	1.82[2]
killed after	12 min.	3.1 d.	11.1 d.	15 min.	30 min.	4 hr.	12.5 hr.	7.2 d	15 min.	12.5 hr.	8.8 d.	29 d.
Activity of proteins in one gram tissue[1] in percent of injected activity $\times 10^3$												
Kidney	1060	0.11	0.10	—	—	—	84	4.4	—	87	9.9	3.1
Heart	75	0.22	—	—	—	—	—	4.5	—	75	9.3	2.8
Spleen	100	0.88	—	160	144	89	64	3.9	41	69	8.8	4.6
Lung	89	0.46	0.15	—	—	—	79	6.5	—	84	11.7	3.2
Liver[1]	73	0.69	0.08	143	114	57	20	1.8	29	35	3.7	1.3
Bone marrow[3]	360	0.39	0.16	—	—	—	—	5.3	—	—	—	—
Blood (1 ml)	490	0.98	0.06	1020	770	700	540	22	277	520	70	15.7
Relative activity of the proteins of subcellular fractions[4]												
Liver[1] fractions:												
Nuclear	0.3	1.07	—[6]	0.52	0.76	1.04	1.04	1.19	0.77	0.95	0.90	0.98
Nuclear washing[5]	1.0	2.28	—	1.03	1.10	1.16	1.10	0.94	—	1.1	1.09	1.24
Mitochondrial	1.83	1.55	—	1.00	1.80	0.86	0.71	1.42	1.73	0.93	0.99	0.93
Microsomal	1.68	0.78	—	2.40	1.15	0.97	0.97	1.38	1.52	1.21	0.79	1.17
Supernatant	0.73	0.71	—	0.45	0.51	1.03	1.02	0.64	0.67	0.92	1.10	1.20
Spleen fractions:												
Nuclear	0.44	1.04	—	0.48	0.58	0.71	0.68	0.71	0.73	0.75	0.54	0.74
Mitochondrial	1.55	1.53	—	2.46	1.30	0.87	0.74	1.86	1.37	0.79	0.77	1.66
Microsomal	1.19	2.42	—	3.30	1.45	1.28	0.76	1.34	1.09	1.30	0.75	2.52
Supernatant[1]	2.41	0.30	—	1.5	1.27	1.42	2.04	0.89	1.20	1.8	1.61	1.38

[1] The liver was perfused with 0.25 M sucrose solution; the other organs and the supernatant fractions of the spleen homogenate are contaminated by blood.

[2] Counted in a Q-gas flow counter.

[3] Assuming that 1 g. bone marrow contains an average of 80 mg. protein; see ref. 1.

[4] The activity of the proteins of the whole homogenate is set equal to 1.0.

[5] In some experiments the nuclei were suspended in 0.88 M sucrose solution, centrifuged, and the proteins of the washing were investigated.

[6] Too weak for measurement.

adsorption of the radioactive material rather than incorporation into definite cellular constituents. However, 7—8 days after injection, when most of the antigenic beef serum γ-globulin is removed from the blood (Rabbit 105), incorporation of the injected antigen into the cytoplasmic granules of liver and spleen is manifested by the high relative activity of the mitochondrial and microsomal proteins and by the simultaneous drop in the activity of the proteins of the cell sap. No such phenomenon is observed after injection of the non-antigenic, homologous, rabbit serum γ-globulin into rabbits (Rabbit no. 138 and 127), where the relative activity of the proteins of the cell sap remains high. It would seem, accordingly, that we have to differentiate between two processes: (I) nonspecific combination of antigenic, as well as non-antigenic proteins, with all subcellular protein fractions during the period of high concentration of the injected protein in blood and lymph, and (II) true incorporation of the injected protein into the cytoplasmic granules. Reaction (II) is obscured by reaction (I) during the period of retention of the proteins in the blood. When the concentration of the injected protein in the blood decreases, reaction (II) becomes apparent. Owing to the short half-life of radio-iodine our experiments could not be extended over periods of more than 3—4 weeks. However, similar results were obtained in preliminary experiments with S^{35}-labeled proteins[10].

Support of this work by research grants from the U. S. Atomic Energy Commission, the Office of Naval Research, and the American Cancer Society, upon recommendation of the Committee on Growth of the National Research Council, is gratefully acknowledged.

Summary.

Rabbits were injected with ovalbumin, bovine serum globulin, and rabbit serum globulin; the proteins were labeled by traces of radio-iodine. Ovalbumin is rapibly eliminated from the blood and deposited in the reticuloendothelial organs where it is concentrated in the cytoplasmic granules. Rabbit serum globulin is present in the blood in higher concentration than in the tissues at all times up to 29 days. Bovine serum globulin behaves during the first days like the homologous globulin; after the onset of antibody formation it disappears from the blood, but is found in the cytoplasmic granules of liver and spleen over long periods of time. During the period of high concentration of the injected proteins in the blood, the specific incorporation of antigenic protein into the cytoplasmic granules of liver and spleen is obscured by nonspecific combination of the injected protein with all subcellular fractions.

Bibliography.

[1] Haurowitz, F., a. C. F. Crampton: J. of Immun. **68**, 73 (1952). — [2] Crampton, C. F., H. H. Reller a. F. Haurowitz: Fed. Proc. (Washington) **11**, 464 (1952). — [3] Warren, S., a. F. J. Dixon: Amer J. Med. Sci. **216**, 136 (1948). — [4] Dixon, F. J., S. C. Bukantz a. G. J. Dammin: Science (Lancaster, Pa.) **113**, 274 (1951). — [5] Dixon, F. J., S. C. Bukantz, G. J. Dammin a. D. W. Talmage: Fed. Proc. (Washington) **10**, 553 (1951). — [6] Knox, W. C., a. F. C. Endicott: J. of Immun. **65**, 515 (1950). — [7] Latta, H.: J. of Immun. **66**, 635 (1951). — [8] Hawn, C. V. Z., a. C. A. Janeway: J. of Exper. Med. **85**, 571 (1947). — [9] Dixon, F. J., a. S. Warren: Amer. J. Med. Sci. **219**, 414 (1950). — [10] Reller, H. H., C. F. Crampton a. F. Haurowitz: Amer. Chem. Soc., 121st meeting **1952**, p. 37 C.

Dr. Felix Haurowitz, Dep. of Chemistry, Indiana University, Bloomington, Ind.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 17—22 (1953).

Department of Pharmacology, Oxford University.

Localization of Adrenaline in Cytoplasmic Particles of the Bovine Adrenal Medulla*.

By

H. Blaschko and A. D. Welch**.

(Eingegangen am 16. Januar 1953.)

The observations described in this contribution are presented as a token of admiration and respect for Otto Loewi, whose pioneer work opened up an experimental approach to the study of the biochemical processes associated with the transmission of nervous impulses.

Preliminary experiments (to be described elsewhere) suggested that the adrenaline present in a saline homogenate of the bovine adrenal medulla is only partially in a freely diffusible form. Accordingly, experiments were done in which the adrenal medullae were subjected to a treatment similar to that developed for the isolation of cytoplasmic cell constituents: mitochondria, microsomes and particle-free cell sap.[1, 3]. This treatment consists in homogenizing the tissue in a non-electrolyte medium and then separating the particles from the cytoplasmic sap by high-speed centrifuging, all these manipulations being done at 0° C.

In the following a typical experiment will be described in detail. Suprarenal glands were obtained from freshly killed cattle and the cortical tissue was removed as quickly as possible. The medullary substance was weighed and homogenized in a glass-grinder in an isotonic solution of sucrose (0,25 M; 0° C), a procedure which required about 15 min. Finally, the total volume was adjusted so that 10 ml. of homogenate represented 1 gramme of medullary tissue.

This homogenate was subjected to low-speed centrifugation at 0° C for 30 min at 950 g, a treatment which caused the sedimentation of unbroken cells, including erythrocytes, as well as nuclei and other large cell-fragments. From the supernatant material, which was utilized for the subsequent fractionation, an aliquot was taken and acidified with an equal volume of N-HCl, and stored at —10° C. At an appropriate time, this aliquot was thawed, neutralized with N-NaOH, and, after suitable dilution with an isotonic solution of NaCl, was injected intravenously into a spinal cat. Aliquots of all fractions were treated in an identical manner. The pressor activity was compared with that of a solution of l-adrenaline hydrochloride, since it is well-known that the pressor activity of the bovine adrenal medulla is to be attributed predominantly to adrenaline rather than to noradrenaline.

---

* Dedicated to Professor Otto Loewi on occasion of his 80th birthday.

** One of us (A. D. W.) gratefully acknowledges the opportunity to pursue these investigations, as a Fulbright Senior Research Scholar, in the laboratories of Professor J. H. Burn. Present address: Department of Pharmacology, Yale University, New Haven, Conn., U. S. A.

The supernatant fluid from low speed centrifugation (Fraction A of Table I) was a very turbid suspension; in this experiment the assay indicated an adrenaline content of 960 μg. per ml., corresponding to 9,6 mg. of adrenaline per gramme of adrenal medulla. This is in keeping with published findings[2] on the adrenaline content of the bovine adrenal medulla and indicates that little adrenaline had been lost in the discarded fraction.

Fraction A was centrifuged for half an hour at a gravitational force, measured at the bottom of the centrifuge tube, of 22000 times g. The sediment was tightly packed; the supernatant, which was almost clear, was decanted and replaced by an equal volume of ice-cold isotonic sucrose. The sediment was stirred and gently rubbed to give a suspension which was filtered through a plug of cotton wool.

Samples of the two fractions were assayed on the spinal cat. The supernatant (Fraction B of Table I) contained 270 μg. of adrenaline per ml.; the resuspended sediment (Fraction C) contained 600 μg. of adrenaline per ml. In other words, only 28% of the adrenaline content of fraction A was in the supernatant fluid; the sediment contained 62%. The two fractions together accounted for 90% of the adrenaline content of the original low-speed supernatant.

The resuspended sediment (Fraction C) was again subjected to 30 min. centrifugation at 0° C and 22000 times g. This resulted in an entirely clear supernatant fluid; this was decanted and the sedimented particles were suspended in ice-cold isotonic sucrose as before.

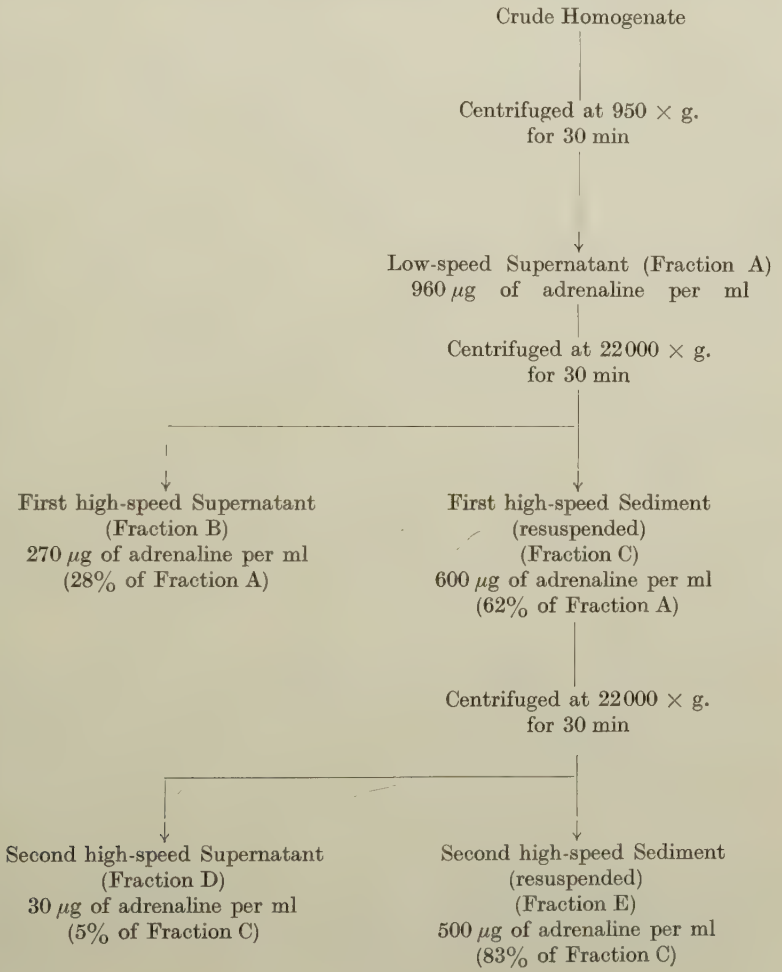
The supernatant fluid (Fraction D of Table I) was found to contain 30 μg. adrenaline per ml.; the resuspended sediment (Fraction E) contained 500 μg. of adrenaline per ml. Thus, the two fractions together acounted for 88% of the total activity of fraction C from which they were derived: the supernatant fluid contributed only 5% to this total, and the sediment contained 83%.

The centrifugation procedure and the results obtained in the adrenaline assay are summarized in Table I.

So far, we have only described the assay of fractions that were tested after destruction of the particulate matter by hydrochloric acid and freezing at —10° C. In addition we have also injected intravenously the resuspended first high-speed sediment (Fraction C) *without previous acid treatment*. The height of the pressor response was equivalent to 120 μg. of adrenaline per ml., or one-fifth that exerted by the same fraction after acid treatment. It must be emphasized, however, that the shape of the blood pressure curve after the injection of the undenatured particle fraction differed from that of an aqueous solution of adrenaline, or that of the acid-treated fractions, in that there was a significant prolongation of the time required for the pressure to return to normal.

That the activity of the suspended sediment was only partly due to adrenaline in free solution is shown by the fact that upon removal of the particles by centrifugation an activity corresponding to only 30 μg. of adrenaline per ml. remained.

Table 1. Fractionation of a homogenate of the bovine adrenal medulla and adrenaline content of fractions obtained.



Discussion.

What do we learn from the experiment that we have just described? We learn from it firstly that the adrenaline content of the bovine adrenal medullary cell is divided between the cytoplasmic cell sap, which

contains less than 30% of the total activity, and the particulate fraction which contains the greater part of the activity. Secondly, we learn that the particles give up only a very small part of their adrenaline content when they are resuspended in an ice-cold isotonic sucrose solution.

Can our observations be useful for the understanding of the localization of adrenaline in the intact medullary cell? It seems permissible to conclude that in the living cell also the adrenaline is mainly held in particles. This is in agreement with the finding of the histologists who tell us that the chromaffine reaction is given by granules. As to the distribution of adrenaline between cytoplasmic sap and particulate fraction, it seems likely that our finding of 30% of adrenaline in the sap is probably too high: some particles are likely to have been fragmented in the treatment of the tissue and, secondly, the suprarenal glands from animals killed without certain precautions may not justly be considered as glands at rest. On the other hand, one might consider the possibility that some adrenaline was absorbed on to the surface of the particles: our observations on the pressor response after injection of the undenatured particles suggest that not more than one-fifth of the total adrenaline-like activity of the particles was present in a condition in which it was able to exert an immediate effect in the spinal cat.

The particles which contain the adrenaline have sedimentation properties ascribed to mitochondria in other tissues, e.g. the rat liver. A thorough cytological and cytochemical examination would be necessary, however, to establish whether or not the particles which carry the adrenaline are mitochondria. We shall call them *pre-secretory granules*, a terminology that is in accord with the nomenclature used by the histologists.

Our experiments suggest that a diffusion barrier exists in the cell which prevents the setting up of a rapid equilibrium between the adrenaline in the two cytoplasmic fractions. It will be interesting to find out in what way our findings at 0° C and in isotonic sucrose are related to the conditions present in the living cell. This question is connected with the problems of biosynthesis and release of active material. As to the formation of adrenaline in the medullary cell, it will be necessary to make a thorough study of the intracellular localization not only of the other phenolic compounds which are known to be present in the bovine adrenal medulla, but also of the enzymes which catalyse the reactions in which these compounds participate.

The question as to the equilibrium between adrenaline in the particulate fraction and the cytoplasmic sap is closely bound up with that of the mechanism of release. If it is true that the bulk of active material is not freely distributed in the cytoplasm, but contained in a structure not in immediate contact with the cell membrane, we must ask: What

happens inside the cell when nervous impulses reach it? The biochemical event at the cell membrane is bound up with the metabolism of the mediator, in our case acetylcholine. According to current ideas, the liberation of acetylcholine from the splanchnic nerve results in an increased permeability of the membrane of the secreting cell. This would lead to a loss of adrenaline present in the cytoplasmic sap. How is the adrenaline content of the sap maintained? Two possibilities have to be considered: either the granule allows adrenaline to pass into the cell sap, be it by diffusion or by active transport, or the granule disintegrates and thus gives off its adrenaline to the cell sap. In either case, we must ask what event is responsible for the redistribution of secretion product in the cell? It seems likely that a study of the metabolic events in the cell will help us in the understanding of these processes.

A third possibility for the release of active material is suggested by our experiments on the pressor action of the undenatured granules, and that is the release of granules carrying active material by the cell. This possibility is not excluded, but no histological observations suggesting this mode of release from the adrenal medulla are known.

We believe that a preparation like that used in our experiments will be found useful in the analysis of the mechanism of intracellular release. It seems obvious that similar reasoning can be applied to the pituitary gland, the pancreas and the other endocrine or exocrine organs. Possibly we have worked with a particularly suitable tissue for such a study. An endocrine organ derived from nervous tissue, the adrenal medulla may be considered as intermediate between endocrine and nervous tissue. There are indications that in the brain acetylcholine may be held in particles in the resting cells, and also that histamine is similary distributed in the dog's liver[4]. Disruption of the cells in a suitable medium and at low temperature may reveal that Trethewies „cell debris" is in fact preformed particles. Such an interpretation would be in harmony with a concept that regards „secretion" from glandular tissue and „liberation" from nerves as events that are fundamentally related.

Summary.

1. Cell-free homogenates of the bovine adrenal medulla, prepared in ice-cold isotonic sucrose, contain at least two-third of their pressor activity in a fraction of granules which can be sedimented on a fast centrifuge.

2. These granules, when resuspended in isotonic sucrose at 0° C, do not give up much adrenaline to the surrounding fluid.

3. If the fresh undenatured granules are injected into the spinal cat, the blood pressure rise shows a maximum equal to that attained after

the injection of one-fifth of their adrenaline content; the return of blood pressure to normal is less rapid than after a dose of adrenaline.

4. These findings are discussed in relation to the problems of release and secretion.

References.

[1] Hogeboom, G. H., W. C. Schneider and G. E. Pallade: J. of Biol. Chem. **172**, 619 (1948). — [2] Schild, H.: J. of Physiol. **79**, 455 (1933). — [3] Schneider, W. C., a. G. H. Hogeboom: Cancer Research **11**, 1 (1951). — [4] Trethewie, E. R.: Austral. J. Exper. Biol. a. med. Sci. **16**, 225 (1938). — [5] Welch, A. D., a. H. Blaschko: Fed. Proc. (in print.)

Dr. Hermann Blaschko, Department of Pharmacology, Oxford University.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 23—29 (1953).

Biological Laboratories, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, U.S.A.

Excitation of the Heart of Venus mercenaria*.

By
John H. Welsh.

With 4 figures in the text.

(Eingegangen am 2. März 1953.)

The visceral ganglion of the lamellibranch mollusc, *Venus mercenaria*, supplies the heart with regulatory nerves. When the ganglion is electrically stimulated acetylcholine is released in the heart and there is a slowing of the beat and decrease in amplitude, or a stoppage of the heart, depending on the intensity and duration of the stimulus (Prosser[9]; Welsh and Slocombe[13]). This is a situation analogous to that in the vertebrate heart as first shown by Loewi[7].

The earlier observations on *Venus mercenaria* failed to give clear evidence for an opposing excitatory mechanism. Budington[2] found no acceleration when the different ganglia were stimulated electrically. However, Carlson[3] showed some excitation following recovery from inhibition. In several other species of molluscs Carlson[3] observed excitation only, following stimulation of ganglia or direct stimulation of the heart. He concluded that some molluscan hearts are supplied only with inhibitor nerves, others with excitor nerves, and some with mixed nerves. Whether excitor nerves release, in the molluscan heart, a substance comparable to adrenaline seems not to have been demonstrated — at least not for *Venus mercenaria*.

In the course of studying the acetylcholine mechanism of the *Venus* heart (Welsh and Taub[10, 11, 12]; Welsh and Slocombe[13]) some attention was devoted to substances that excite the isolated ventricle. Recently, evidence for the existence of a normal excitatory mechanism has been obtained. These findings will be presented in this paper.

Methods.

The ventricle was isolated, suspended in a bath of sea-water, and allowed to record on a kymograph as described by Welsh and Taub[6]. When drugs were used they were added to the sea-water surrounding the heart.

To observe the effect of stimulation of the cardio-regulatory nerves the left valve was removed and the pericardium cut away. A small clip attached to the ventricle led to a light isotonic lever. Electrodes were placed on the visceral ganglion which lies on the surface of the posterior adductor muscle, and stimulation was from a Harvard inductorium. Drugs were applied to the outer surface of the heart and were washed off with repeated applications of sea-water.

* In honor of Professor Otto Loewi on his 80th birthday.

Results.

Excitation by acetylcholine antagonists.

When the methyl groups on the nitrogen of choline and acetylcholine are substituted by ethyl groups the compounds are excitatory on the *Venus* heart and block applied acetylcholine (Welsh and Taub[10,11]). All quaternary ammonium compounds containing three or four alkyl groups other than methyl have an excitatory rather than an inhibitory

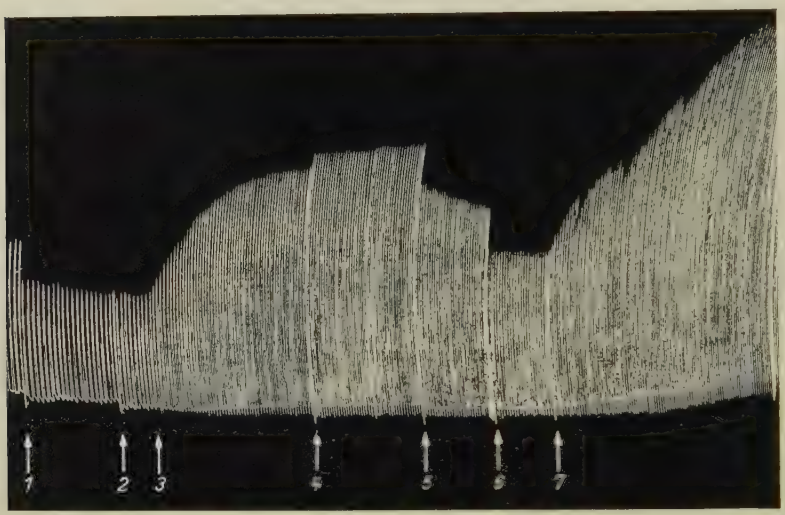


Fig. 1. Record of the action of ergonovine on the isolated heart of *Venus mercenaria* (from experiments by Janice Gorton). *1* Sea-water at p_H 9; *2* Sea-water at p_H 7; *3* 5×10^{-7} ergonovine maleate; *4* Drum stopped for 10 min; *5* After 15 min of washing at p_H 9; *6* After 30 min of washing at p_H 9 changed to sea-water at p_H 7; *7* 5×10^{-7} M ergonovine maleate.

action. Since the *Venus* heart contains acetylcholine it has been concluded that the increase in amplitude and frequency of the heart beat produced by acetylcholine antagonists is due to the blocking of this endogenous acetylcholine (Welsh and Taub[14]). This, then, is one way in which the isolated *Venus* heart, or ventricle, may be excited, but it seems unlikely that it is a normal mechanism.

Excitation by ergot alkaloids.

Early in our work on the *Venus* heart we looked for an agent that might revive hearts whose beat was weak and irregular. We found certain of the ergot alkaloids suitable for this purpose. A ten-minute application of 10^{-6} M ergotoxine ethanesulfonate will often increase the amplitude of beat two or three times. Repeated washing over a period of 12 to 24 hours failed to restore the amplitude of beat to the original level. This persistent action of the ergot alkaloids on the *Venus* heart

is most remarkable. The removal of an ergot alkaloid from the heart tissue is facilitated by making the sea-water alkaline. In Fig. 1 is first shown the effect of a brief (2 min.) application of sea-water brought to p_H 9 with NaOH. The fluid in the bath was then changed to sea-water at p_H 7. An amount of ergonovine maleate was then added to the bath to give a concentration of 5×10^{-7} M. The characteristic increase in amplitude was obtained. The amplitude was reduced by washing at p_H 9 and the same concentration of ergonovine maleate again applied. In this instance the response was greater than the preceding one. By employing alkaline washes to remove the ergot alkaloids it should be possible to use the *Venus* heart, or other molluscan hearts, for the bioassay of this group of compounds.

The ergot alkaloids that we have tested on the *Venus* heart probably do not owe their excitatory action to the blocking of endogenous acetylcholine. The level of activity of a given dose of applied acetylcholine is affected but little by the presence of ergotoxine or ergonovine. A possible interpretation of the excitatory action of the ergot alkaloids on the *Venus* heart will be offered later.

Excitatory action of adrenaline, noradrenaline, tyramine and histamine.

For some time it has been known that adrenaline-like substances occur in molluscan ganglia (Bacq[1]). Both adrenaline and noradrenaline were found to excite the isolated ventricle of *Venus* but only in relatively high concentrations (Fig. 2a and b). At about 5×10^{-5} M there was an increase in frequency accompanied by a general contraction of the heart. At 10^{-4} M this was very marked and frequently the heart was arrested in systole. After repeated application of 10^{-4} adrenaline, with washing out between applications, there was some development of resistance but we never observed a reversal of the adrenaline action with this procedure.

Tyramine and histamine were mildly excitatory at 10^{-4} M. Considering the low level of activity of these amines when applied to the *Venus* heart it would seem unlikely that any one of them could be a normal excitatory substance for this organ.

The action of 5-hydroxytryptamine (enteramine or serotonin).

Erspamer and Ghiretti[5] showed that extracts of posterior salivary glands of *Octopus vulgaris* and *Eledone moschata*, as well as of the hypobranchial body of *Murex trunculus* and *M. brandaris*, had a powerful excitatory action on the isolated hearts of *Helix* and *Octopus*. They presented highly suggestive evidence that the active constituent was the amine that Erspamer had named enteramine. The following year Erspamer and Asero[6] identified enteramine as 5-hydroxytryptamine. This is only one of a number of related compounds that have been isolated from certain molluscan tissues (Erspamer and Boretti[4]), but on the molluscan heart it seemed to be the one having the greatest activity.

5-Hydroxytryptamine creatinine sulfate, supplied by the Abbott Laboratories, when tested on the isolated *Venus* heart was found to have remarkably high stimulatory action. Fig. 3 show the action of this compound along with the action of an extract suspected of containing

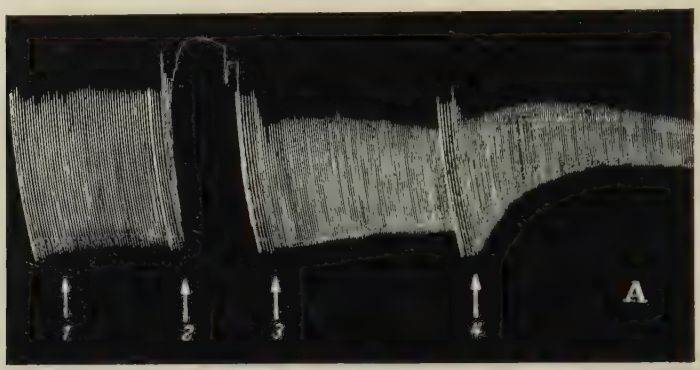


Fig. 2a. Record of the action of adrenaline on the isolated *Venus* heart. *1* 10^{-5} M adrenaline; *2* 10^{-4} M adrenaline; *3* 5×10^{-5} M adrenaline; *4* 8×10^{-5} M adrenaline.

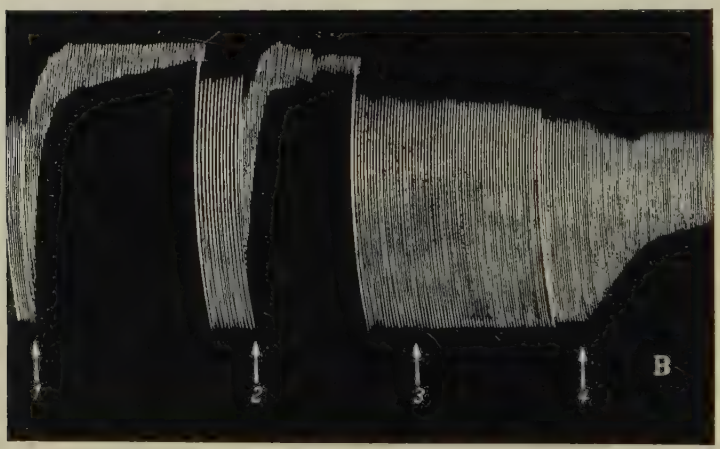


Fig. 2b. Record of the action of noradrenaline on the isolated *Venus* heart. *1* 10^{-4} M noradrenaline; *2* Same; *3* 10^{-5} M noradrenaline; *4* 5×10^{-5} M noradrenaline.

5-hydroxytryptamine. With most hearts the threshold concentration of 5-hydroxytryptamine was about 10^{-10}M. At 10^{-6} M the action was immediate and violent. Shortening of the heart, such as occurs with adrenaline, was not observed.

This great sensitivity of the *Venus* heart to 5-hydroxytryptamine led us to consider the possibility that it could be a normal excitatory substance for this organ. Hence experiments were done to test this idea.

Stimulation of the visceral ganglion.

When the *Venus* heart is left in situ, the beat recorded, and the visceral ganglion stimulated with an interrupted current the frequency of beat is slowed and the amplitude decreased at low voltages or, if the voltage is increased, the heart stops in diastole (Fig. 4—*1*). Following stimulation there is often a period of increased amplitude and frequency as was the

Fig. 3. Record of the action of 5-hydroxytryptamine and of an extract containing this or a related substance on the isolated *Venus* heart. *E* Extract; *M* 10^{-6} M Mytolon; $S^6 - S^9$ 5-Hydroxytryptamine creatinine sulfate at increasing concentrations from 10^{-6} M to 10^{-5} M.

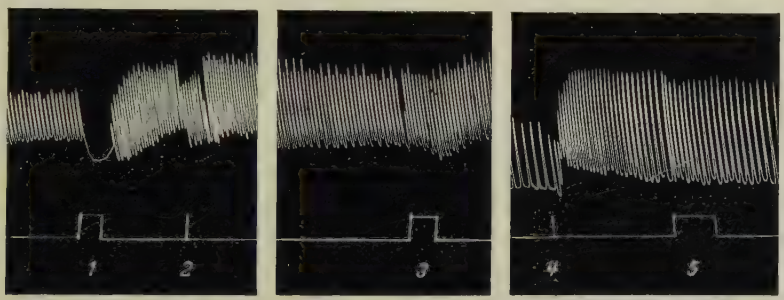


Fig. 4. Record of the response of the *in situ* heart of *Venus* to stimulation of the visceral ganglion before and after the application of various drugs to the heart. *1* Stimulation of the ganglion with interrupted current from inductorium; *2* Few drops of 10^{-5} M Mytolon applied to heart. Irregularity due to mechanical disturbance; *3* Stimulation as in *1*; *4* Few drops of 10^{-5} M 5-hydroxytryptamine creatinine sulfate placed on the heart; *5* Stimulation as in *1* and *3* but for a slightly longer period of time.

case with the heart recorded in Fig. 4. Mytolon or 2,5-bis(3-diethylaminopropylamino)-benzoquinone-bis-benzyl chloride (supplied by Sterling-Winthrop) is the most effective acetylcholine antagonist yet known for the *Venus* heart (Luduena and Brown[8]; Welsh and Taub[14]). After its application, stimulation of the visceral ganglion, at any intensity, fails to produce inhibition as in Fig. 4—*3*. Instead there may be excitation during stimulation or, for a time, following interruption of the stimulus. Now if the heart is washed and a properly chosen concen-

tration of 5-hydroxytryptamine creatinine sulfate is applied to the ventricle there is a period of excitation (Fig. 4—*4*) resembling very closely that during recovery from inhibition produced by stimulation of the visceral ganglion. If the 5-hydroxytryptamine is allowed to remain on the heart for some minutes, subsequent stimulation of the ganglion usually fails to produce either inhibition or excitation. It is as though Mytolon, which washed out slowly, was blocking released acetylcholine and the 5-hydroxytryptamine was blocking a released excitatory substance.

If one had a highly specific antagonist to 5-hydroxytryptamine on the *Venus* heart it could be used to obtain further evidence for the normal excitatory role of this substance. Our preliminary attempt to locate such an antagonist will be reported briefly.

Action of certain indole derivatives.

With the assistance of Miss Martha Nicely a few readily obtained indole compounds have been tested on the isolated *Venus* heart. Brief mention of some of the results will be made. L-Tryptophan and indole acetic acid at 10^{-4}M concentrations have an inhibitory action on the isolated ventricle as though they might be blocking an endogenous excitatory substance. As antagonists to applied serotonin, however, they were only mildly effective.

Indole 3-acetamide at 10^{-4}M and 2-methyl-3-ethyl-5-nitroindole (Abbott Laboratories) were excitatory, resembling 5-hydroxytryptamine in their actions. An active antagonist for 5-hydroxytryptamine action on the *Venus* heart remains to be found.

Discussion.

There appear to be two fundamentally different ways in which the chemical substances under discussion may act on the isolated heart of the mollusc, *Venus mercenaria*, to produce an increase in amplitude and frequency of the beat. One is through the blocking of endogenous acetylcholine (normally depressant) by the use of antagonists known to be effective on the *Venus* heart, for example Mytolon. The other is through the use of amines which may mimic the action of a normally acting excitatory amine. The high activity of 5-hydroxytryptamine on the *Venus* heart, coupled to the fact that it occurs normally in certain molluscs (Erspamer), makes it a likely normal mediator of nervous excitation of the heart. That there may be excitor nerves to the *Venus* heart is strongly suggested by the results obtained when the visceral ganglion is electrically stimulated following the application of Mytolon to the heart. Mytolon so effectively blocks such inhibitory acetylcholine as may be released during simultaneous stimulation of excitor and inhibitor neurons, that only excitation is seen.

Before more final conclusions may be drawn regarding a normal role for 5-hydroxytryptamine in the nervous excitation of the *Venus* heart, or the heart of

other molluscs, we must know more concerning its occurrence in molluscan nerve and muscle tissue. Using the methods developed by ERSPAMER for the isolation and identification of enteramine it should be possible to take this further step.

For some years, as we have used the ergot alkaloids to improve the amplitude and rhythmicity of *Venus* hearts, we have thought about their mode of action on this organ. Lysergic acid contains the indole structure and may be looked upon as a complex analogue of 5-hydroxytryptamine. It is possible to conceive of the ergot alkaloids as compounds that mimic 5-hydroxytryptamine in the *Venus* heart and which, because of high stability and the property of strongly adsorbing to cell surfaces, are active in low concentrations and have a highly persistent action.

Although the pharmacology of the *Venus* heart differs in detail from that of the vertebrates the basic plan of a chemical mediator for inhibitor nerves (acetylcholine) and one for excitor nerves (5-hydroxytryptamine?) appears to be the same. It was, in a large measure, the work of OTTO LOEWI on the vertebrate heart that prompted the study of the pharmacology and physiology of a molluscan heart.

Summary.

1. The isolated heart of the mollusc, *Venus mercenaria*, is excited by compounds known to be acetylcholine antagonists. This excitation is probably due to the blocking of endogenous acetylcholine.

2. Certain of the ergot alkaloids excite the *Venus* heart in low concentrations and strongly resist washing out. They may be removed from the heart tissue by the use of alkaline wash fluid.

3. Adrenaline, noradrenaline, tyramine and histamine are excitatory at relatively high concentrations.

4. 5-Hydroxytryptamine (enteramine, serotonin) excites the *Venus* heart at concentrations as low as 10^{-10}M. Electrical stimulation of the regulatory nerves to the heart produces an action similar to that produced by applied 5-hydroxytryptamine. The evidence suggests that this substance may be a normal mediator for the excitatory nerves of this heart.

Literature.

[1] BACQ, Z. M.: Arch. Internat. Physiol. **42**, 24 (1935). — [2] BUDINGTON, R. A.: Biol. Bull., Lancaster **6**, 311 (1904). — [3] CARLSON, A. J.: Amer. J. Physiol. **13**, 396 (1905). — [4] ERSPAMER, V., and G. BORETTI: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 296 (1951). — [5] ERSPAMER, V., and F. GHIRETTI: J. of Physiol. **115**, 470 (1951). — [6] ERSPAMER, V., and B. ASERO: Nature **169**, 800 (1952). — [7] LOEWI, O.: Arch. Physiol., Bonn **189**, 239 (1921). — [8] LUDUENA, F. P., and T. G. BROWN, jr.: J. of Pharmacol. **105**, 232 (1952). — [9] PROSSER, C. L.: Biol. Bull., Lancaster **78**, 92 (1940). — [10] WELSH, J. H., and RAE TAUB: Biol. Bull., Lancaster **95**, 346 (1948). — [11] WELSH, J. H., and RAE TAUB: J. of Pharmacol. **99**, 334 (1950). — [12] WELSH, J. H., and RAE TAUB: J. of Pharmacol. **103**, 62 (1951). — [13] WELSH, J. H., and A. G. SLOCOMBE: Biol. Bull., Lancaster **102**, 48 (1952). — [14] WELSH, J. H., and RAE TAUB: Brit. J. Pharmacol. (in press).

Dr. J. H. WELSH, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 30—34 (1953).

Department of Medicine, The New York Medical College.

Auricular flutter and fibrillation originating in the atrioventricular node* **.

By

DAVID SCHERF.

With 3 figures in the text.

(Eingegangen am 18. Januar 1953.)

Topical application of aconitine on any point of the dog's auricle leads to the appearance of auricular flutter or fibrillation[6, 9]. These arrhythmias persist for more than one hour and permit experimental studies of the mechanism of their origin. Auricular flutter and fibrillation disappear if the treated focus is clamped off from the rest of the auricles. They are also abolished if the area on which aconitine had been applied is cooled by a thermode and re-appear when the clamp is removed or the cooling is discontinued[7].

Fig. 1 shows at the beginning auricular fibrillation which was obtained in an experiment on May 20, 1947. After the animal was anaesthetized with nembutal artificial respiration was instituted and the heart was exposed. A few crystals of aconitine were applied to the area of the head of the sinus node. Cooling this area abolished the fibrillation immediately and 5 sinus beats appeared. Discontinuation of the cooling (arrow) led to the re-appearance of flutter which quickly changed into fibrillation. It should be stressed that this effect of cooling can be reproduced even 20 minutes after the appearance of fibrillation.

If flutter is present, pressure exerted on the aconitine-treated area by a probe increases the auricular rate and when it exceeds about 600 beats per minute, fibrillation appears. Even after fibrillation has disappeared and sinus rhythm again prevails, pressure exerted on the treated area makes fibrillation recur[8]. These experiments speak against a circus movement mechanism, since it is inconceivable that local pressure increase the rate of a circus motion; on the other hand, pressure is known to increase the rate of depolarization and impulse formation. All the experimental data mentioned above demonstrate that flutter and fibrillation originate in one focus firing stimuli rapidly.

---

* This investigation was supported (in part) by a research grant from the National Heart Institute, U. S. Public Health Service.

** Dedicated to Professor OTTO LOEWI on occasion of his 80th birthday.

Topical application of acetylcholine on the dog's auricle also elicits fibrillation. If a square of filter paper with a diameter of 3 mm is moistened with a freshly prepared solution of 2.5 to 5 per cent acetylcholine and is applied to the dog's auricle fibrillation appears within a few seconds[11]. This fibrillation lasts for a shorter period than the aconitine-induced form but can always be re-elicited by stretch or pressure of the treated area. This type of fibrillation which gives the same electrocardiographic picture as that following application of aconitine has, however, an important distinctive quality. Whereas the aconitine fibrillation disappears promptly after cooling the treated spot, the acetylcholine fibrillation does so only if the cooling is performed within 20 seconds after the fibrillations sets in. If acetylcholine is applied to the tip of the auricular appendix and about 20 seconds after the fibrillation starts the appendix is clamped off at its base, the body of the auricle persists fibrillating[12]. The auricular fibrillation induced by acetylcholine disappears only if the sinus *and* the atrioventricular node are cooled simultaneously[10].

These experiments led to the conclusion, that cooling permits the differentiation of two forms of auricular fibrillation: One (aconitine-induced) type is abolished by cooling of the treated focus alone and a second type (induced by acetylcholine) in which centers in the sinus *and* atrioventricular node are active.

We anticipated that in dogs in whom the sinus node had been clamped off from the rest of the auricle, acetylcholine flutter or fibrillation would promptly stop whenever the atrioventricular node alone was cooled. This was actually found to be the case. The results obtained in these experiments are described with the aid of Fig. 1 b, 2 and 3.

Experimental results. In the experiment in which Fig. 1 b was registered the application of acetylcholine to the area of the head of the sinus node, performed in the manner described above, had caused auricular flutter with a rate of about 500 (beginning of Fig. 1 b). After the sinus node had been clamped off, the heart was lifted from its pericardial bed. A cooling thermode was applied to the coronary sinus vein in order to inhibit the atrioventricular node. This was not succesful, but when the thermode was moved to the vena cava inferior and the node was cooled through its wall[5] the flutter stopped. A few atrioventricular beats appear with deeply inverted P waves. The flutter re-appeared a few seconds after interruption of the cooling. This experiment was twice repeated with the same results. We may therefore conclude that the flutter originated in the atrioventricular node.

In Fig. 1 b the P waves or "F" waves are positive. This is not rare with stimuli originating in the atrioventricular node in the dog. Occasionally the F waves changed from positive to negative during the cooling.

Thus in Fig. 2, which was obtained shortly after Fig. 1b auricular flutter existed with a rate of 330. While the atrioventricular node was cooled through the vena cava inferior the positive F waves changed into deep

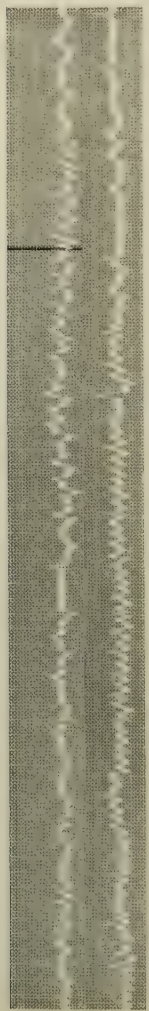


Fig. 1. In Fig. 1a Aconitine induced fibrillation is transformed into sinus rhythm by cooling the area on which aconitine has been applied. Discontinuation of the cooling leads to flutter and finally to fibrillation. The black vertical line in Fig. 1a does not indicate interruption of the registration. It is due to a slowdown of the movement of the photographic paper which lasted only a few hundreds of a second. In Fig. 1b auricular flutter, induced by topical application of acetylcholine is stopped by cooling of the atrioventricular node; previously the sinus node had been clamped off.

Fig. 2. Acetylcholine caused auricular flutter; during cooling of the atrioventricular node the flutter waves become inverted and sinus rhythm appears.

Fig. 3. Auricular fibrillation caused by topical application of acetylcholine disappears during cooling of the atrioventricular node (Fig. 3a). The fibrillation re-appeared a few seconds later after termination of the cooling (Fig. 3b). The sinus node had been crushed by clamping.

negative ones maintaining the same rate; shortly afterward the flutter stopped. A few atrioventricular beats and finally sinus rhythm appeared.

The same results were obtained during the presence of auricular fibrillation. In the experiment of May 15, 1952 the sinus node was

clamped and acetylcholine was applied to the right lateral wall of the auricle. Auricular fibrillation appeared within a few seconds. The heart was again lifted from its bed and the atrioventricular node was cooled in the manner described above. Fig. 3a shows the disappearance of fibrillation during the cooling and the atrioventricular rhythm immediately after it. Fig. 3b was taken 6 seconds later and shows the spontaneous re-appearance of fibrillation.

Discussion. These experiments demonstrate for the first time that auricular flutter and fibrillation may be caused in the mammalian heart by a tachysystolic center located in the atrioventricular node. This is a mechanism which has been advocated earlier by HERING[3].

The rapidity with which acetylcholine, topically applied, induces distant centers to form rapid stimuli is remarkable. In contrast to the aconitine-induced fibrillation cooling of the area treated with acetylcholine stopped the fibrillation only if performed within 20 seconds. Later it was devoid of effect. One may therefore assume, that under the influence of acetylcholine distant centers, located in the spezialized fibers of the heart are induced to fire stimuli rapidly. Recent investigations demonstrate the presence of positive inotropic and dromotropic effects of acetylcholine[1, 2, 4]. While the concentrations of acetylcholine used by us were un-physiological, the results which were obtained despite strict avoidance of spilling and diffusion are significant.

If sinus node and atrioventricular nodes are intact acetylcholine induces centers of impulse formation which sustain the fibrillation in both nodes. If the sinus node is clamped off, the centers in the atrioventricular node alone maintain the fibrillation.

Summary and conclusions. In aconitine induced fibrillation cooling of the treated area alone abolishes the arrhythmia. In acetylcholine-induced fibrillation centers in both the sinus- and the atrioventricular nodes are active and cooling of the area on which acetylcholine has been applied does not abolish the fibrillation.

In the dog heart in situ, after topical application of acetylcholine and clamping off the sinus node, cooling of the atrioventricular node promptly abolished auricular flutter or fibrillation respectively.

The opinion is expressed that these results prove that a tachysystolic center in the atrioventricular node causes these arrhythmias under the conditions of the experiments.

References.

[1] BURN, J. H.: Proc. roy. Soc. B. **137**, 281 (1950). — [2] BÜLBRING, E., a. J. H. BURN: J. Physiol. **108**, 508 (1949). — [3] HERING, H. E.: Münch. med. Wschr. **61**, 2057 u. 2096 (1914). — [4] ROTSCHUH, K. E., u. H. BAMMER: Z. exper. Med. **119**,

327 (1952). — [5] Scherf, D.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **56**, 220 (1944). — [6] Scherf, D.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **64**, 233 (1947). — [7] Scherf, D., F. J. Romano a. R. Terranova: Amer. Heart J. **36**, 241 (1948). — [8] Scherf, D., M. M. Scharf, a. M. F. Goklen: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **70**, 708 (1949). — [9] Scherf, D., a. R. Terranova: Amer. J. Physiol. **159**, 137 (1949). — [10] Scherf, D., L. J. Morgenbesser, E. J. Nightingale a. K. T. Schaeffeler: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **73**, 650 (1950). — [11] Scherf, D., a. F. B. Chick: Circulation (Baltimore) **3**, 764 (1951). — [12] Scherf, D., A. I. Schaffer a. S. Blumenfeld: Mechanism of flutter and fibrillation Arch. int. Med. 1953.

Dr. David Scherf, Flower and Fifth Avenue Hospital, 1 East 105th Street, New York City, N.Y., USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 35—42 (1953).

Aus der Pharmakologischen Abteilung der Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois, U.S.A. (Vorstand: Prof. Dr. R. K. Richards).

Zur Pharmakologie quaternärer Procainderivate und ihrer Schutzwirkung gegen Procainkrämpfe, ein Beispiel der Konkurrenzhemmung am Zentralnervensystem*.

Von

Richard Kohn Richards**.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 13. Februar 1953.)

Der Begriff der Konkurrenzhemmung hat sich als eine wertvolle Deutung gewisser antagonistischer Wirkungen in der Biologie erwiesen.

Eines der bekanntesten Beispiele dieser Art ist die Hemmung der bakteriostatischen Wirkung des Sulfanilamids durch PABA, die von Woods beschrieben wurde. Es wird hier angenommen, daß sich p-Aminobenzoesäure (PABA) und der chemisch ähnliche Teil des Sulfanilamids an derselben Stelle im Receptorsystem verankern. Da der Diethylaminoethanol (DEAE) Ester der PABA, nämlich Procain, im tierischen Organismus rasch durch eine Esterase in diese beiden Komponenten gespalten wird, kann die Injektion von Procain gleichfalls zu einer Hemmung der Sulfanilamid-Wirkung führen.

Auf Grund dieser Beobachtungen untersuchten wir die Möglichkeit, ob ein ähnlicher Antagonismus zwischen dem Procain selbst und dessen Spaltprodukten existieren könnte. Eine Reihe Versuche, in denen wir die Beeinflussung der typischen lokalanästhetischen Wirkung des Procains am Kaninchenauge oder an der intracutanen Quaddel in Gegenwart von PABA, DEAE oder einer Mischung dieser beiden prüften, hatten jedoch ein negatives Ergebnis: der anästhetische Effekt des Procains bleibt unbeeinflußt.

Die Versuche wurden dann auf die zentral krampferregende Wirkung des Procains ausgedehnt. Hierbei hat sich uns in Übereinstimmung mit Beütner das Meerschweinchen als besonders brauchbar erwiesen, da es auf Procain über eine genügende Dosenbreite hin mit reproduzierbaren, nicht tödlichen Krämpfen reagiert.

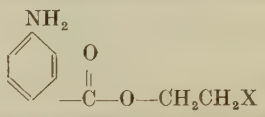
Wir haben in zahlreichen Versuchen gezeigt (Richards 1945, 1946, Richards und Kueter 1946), daß durch intraperitoneale Einspritzung von 400—600 mg/kg PABA als Natriumsalz das Eintreten von Krämpfen auf eine folgende intramuskuläre Gabe von 100 mg/kg Procain-hydrochlorid von 83% auf 56% oder 13%

* Herrn Prof. Dr. Otto Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

** Ehemaliger Assistent am Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg.

reduziert und auch ihre Intensität und Dauer wesentlich vermindert wird. In ähnlicher Weise wirkten 400 mg/kg DEAE-hydrochlorid, da es die Krämpfe auf 9% verringerte. Weder PABA noch DEAE riefen in diesen Dosen irgendwelche Symptome hervor. Die Spezifität dieses Antagonismus wurde eingehend untersucht und

Tabelle. *Pharmakologische Eigenschaften einiger Procainderivate allgemeine Formel.*



Nr.	X	i. p. l. d. 50 Maus mg/kg	Meerschweinchen i. m.	Blutdruckwirkung
I	$N(C_2H_5)_2$ (Procain)	215	100 mg/kg 87% Krämpfe	Katze und Hund: 20 mg/kg: geringer Fall
II	$N(C_2H_5)_3$	55	80 mg/kg Unruhe 100 mg/kg tödlich	Katze: 0,5—2,0 mg/kg: 20—40 mm Fall, selt. Steiger. Hund: 0,5 mg/kg: 30—80 mm Steigerung
III	$N(C_2H_5)_2CH_3$	55	85 mg/kg tödlich	Katze: 0,5—2,0 mg/kg: 10—25 mm Steiger.,selt. Fall Hund: 0,3—0,75 mg/kg: 30—80 mm Steigerung
IV	$N(C_2H_5)(CH_3)_2$	50	45 mg/kg tödlich	Katze: 0,5—2,0 mg/kg 20—60 mm Steigerung Hund: 0,5 mg/kg 60—70 mm Steigerung
V	$N(CH_3)_3$ (p-amino-benzocholin)	50	150—200 mg/kg Zittern, tödlich	Katze: 0,5—1,0 mg/kg 70—120 mm Steigerung Hund: 0,5 mg/kg 50—100 mm Steigerung
VI	$NH(CH_3)_2$	290	200 mg/kg 85% Krämpfe	Katze: 20 mg/kg 30 mm Steigerung

Verbindungen I und VI wurden als salzsaure, II bis V als jodwasserstoffsaure Salze injiziert.

es konnte z. B. gezeigt werden, daß die ortho-Aminobenzoesäure ganz unwirksam ist, während para-Hydroxybenzoesäure und Benzoesäure noch etwas wirksam waren. Ähnliche Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und antagonistischer Wirkung waren an den Aminoalkoholen nachzuweisen. So war ein Schutzeffekt noch bei dem Propanol-, aber nicht mehr dem Butanol-Homologen nachzuweisen usw. Die statistische Zuverlässigkeit der Ergebnisse war in allen

Fällen mit der CHi^2-Methode erwiesen worden. Ein noch stärkerer Schutz gegen Procainkrämpfe konnte durch die Einspritzung einer molekularen Mischung von PABA und DEAE erzielt werden. Unter diesen Bedingungen genügten die Spaltprodukte ven zwei Procainmolekülen um die Krampfwirkung von einem nichthydrolysierten Procainmolekül deutlich zu hemmen. Die hohe Spezifität dieser Wirkung wurde weiterhin an dem Fehlen irgend eines Schutzeffektes dieser Verbindungen oder ihrer Kombination gegen verschiedene andere Krampfgifte erwiesen.

So ergab sich eine Konkurrenzhemmung auf der Basis chemisch konstitutioneller Ähnlichkeiten als die wahrscheinlichste Erklärung dieser Beobachtungen. Auf einer einfachen bildlich schematischen Darstellung dieser Zusammenhänge wird am Ende der vorliegenden Arbeit kurz eingegangen werden.

Im Rahmen weiterer Untersuchungen auf diesem Gebiet wurden einige quaternäre Procainabkömmlinge in der organisch-chemischen Abteilung der Abbott Laboratories von Dr. M. B. Moore hergestellt. Wie sich aus Betrachtung der Formeln ergibt (Tabelle), handelt es sich bei den Verbindungen II—V um alle Zwischenstufen von Triäthylprocain zu seinem Trimethylhomolog. Verbindung VI ist der dem Procain entsprechende Dimethylester. Er ist erheblich weniger giftig und entsprechend schwächer lokalanästhetisch.

Unter den quaternären Verbindungen, denen die lokalanästhetische Wirkung fehlt, ist Nr. V von uns in anderem Zusammenhang untersucht worden, da es sich hier um p-Aminobenzocholin handelt. Die Giftigkeit dieser quaternären Verbindungen ist erheblich größer, als die der tertiären. Sie besitzen deutliche nicotinartige Wirkung auf den Blutdruck (Richards, Roth und Kueter). Auch unabhängig von uns haben sich Hazard und Carteggiani besonders mit der nicotinartigen Blutdruckwirkung der Verbindung Nr. III beschäftigt. Kürzlich bestätigten Hazard und Mitarb. (1951) ebenfalls solche Eigenschaften in der Verbindung Nr. V.

Unsere weiteren Untersuchungen zeigten, daß mit diesen Verbindungen die typischen Procainkrämpfe am Meerschweinchen nicht mehr auftreten, dafür sieht man in höheren Dosen nicotinartiges Zittern, dem schließlich Lähmungen und oft terminal asphyktische Krämpfe folgen.

Reizt man den peripheren N. ischiadicus-Stumpf von Mäusen nach Verabfolgung tödlicher Dosen dieser Verbindungen, so erfolgt keine oder eine stark verminderte Muskelzuckung, während die direkte Muskelerregbarkeit erhalten bleibt. Am Frosch konnte eine typisch curareartige Hemmung der indirekten Muskelerregbarkeit noch besser und nach der Einspritzung nichttödlicher Dosen nachgewiesen werden. Hier schien Verbindung III am wirksamsten zu sein. Während die tödliche Dose für alle 4 Verbindungen an Mäusen ziemlich die gleiche ist, fanden wir am Meerschweinchen merkwürdigerweise das p-Aminobenzocholin (Nr. V) am besten und die Dimethylmonoäthyl-Verbindung (Nr. IV) am wenigsten verträglich.

Die Wirkung der verschiedenen Verbindungen auf den Blutdruck der Katze und des Hundes sind auf der Tab. zusammengefaßt. Während

bekanntlich das Procain (Nr. I) in mäßigen Dosen eine flüchtige und geringe Blutdrucksenkung hervorruft, sahen wir mit dem Dimethyl-Homologen (Nr. VI) meistens eine kurze aber deutliche Blutdrucksteigerung. Dies ist auch kürzlich von Hazard (1952) berichtet worden. Alle diese quaternären Verbindungen bewirkten beim Hund eine Blutdrucksteigerung, die in ihrem Charakter dem Nicotineffekt durchaus gleichartig, aber quantitativ geringer war. Dagegen hatten bei der Katze nur Verbindungen Nr. III—V einen positiven Blutdruckeffekt, während Nr. II meistens eine Senkung hervorrief. Da diese durch Atropin nicht

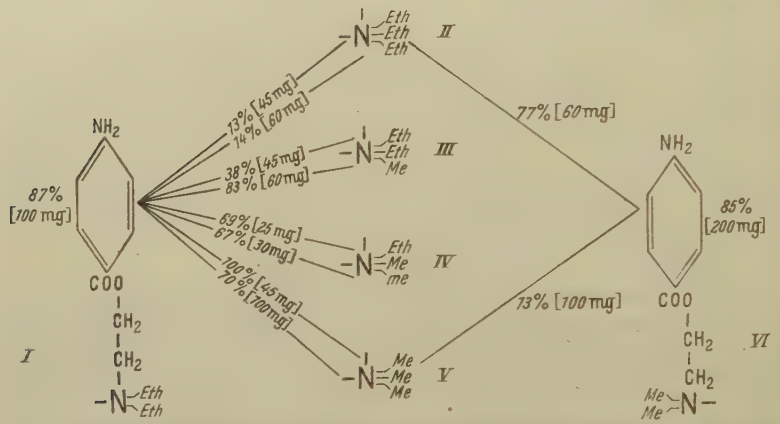


Abb. 1. Alle Dosen in Kilogramm. Alle Injektionen intramaskulär. Meerschweinchen. % bedeutet Vorkommen der Krämpfe (siehe Text).

verhindert wurde, ist sie wahrscheinlich nicht muscarinartig. Am Kaninchen rief sowohl diese Verbindung wie auch Nicotin eine reine Blutdrucksenkung hervor. Unter diesen 4 quaternären Verbindungen schien Nr. V die stärkste Blutdrucksteigerung an Hund und Katze hervorzurufen. Apocodein blockierte die blutdrucksteigernde Wirkung von Nr. II am Hund. Vorbehandlung mit ausreichenden Dosen von Tetraethylammoniumchlorid verringerte oder unterdrückte die Blutdrucksteigerung nach Nicotin oder diesen quaternären Verbindungen. Blockierung der blutdrucksteigernden Wirkung des Adrenalins mit Dibenamine (N-N-Dibenzylchloräthylamin) reduzierte oder verhinderte den positiven Blutdruckeffekt dieser Verbindungen und des Nicotins. Eine Umkehr wie beim Adrenalin wurde mit den quaternären Abkömmlingen in unseren Versuchen nicht beobachtet. Injektionen von 2 mg/kg dieser Verbindungen führten häufig zu einer mäßigen Kontraktion der Nickhaut der Katze. Wurden solche Einspritzungen in rascher Reihenfolge wiederholt, so wurde die elektrische Reizung des prägang-

lionaren Sympathicusnerven des oberen Cervicalganglions unwirksam, doch war diese Lähmung von kürzerer Dauer als nach entsprechender Nicotinanwendung.

Es erschien von Interesse, zu untersuchen, ob zwischen den tertiären Verbindungen und den quaternären Abkömmlingen noch ein ähnlicher Antagonismus nachgewiesen werden konnte, wie zwischen dem Procain und seinen Spaltprodukten (Richards, 1950). Im Gegensatz zu diesem Fall besteht zwischen den tertiären und quaternären Verbindungen nur noch strukturelle, aber praktisch keine pharmakologische Verwandtschaft mehr. Die Versuchsanordnung war ähnlich wie in den früheren Experimenten.

Die intramuskuläre Einspritzung von 100 mg/kg Procain rief Krämpfe in 87% der Meerschweinchen hervor. Für die entsprechende Dimethylverbindung waren für den gleichen Effekt 200 mg/kg nötig. Die verschiedenen quaternären Verbindungen wurden den Tieren als jodwasserstoffsaure Salze intramuskulär injiziert. Von jeder Verbindung wurden zwei Dosen gewählt; die niedere rief keine erkennbaren Symptome hervor, die höhere mäßige Symptome, wie leichte Depression oder Zittern. Eine Ausnahme war Verbindung IV, die zu 30 mg/kg bei einigen Tieren starke Zuckungen auslöste. Nachdem 30—45 min verstrichen waren, wurde eine der beiden tertiären Verbindungen als salzsaures Salz intramuskulär gegeben und die Tiere für 1—2 Std sorgfältig beobachtet. Für jede Versuchsgruppe wurden 12—21 Tiere verwandt, nur für die Versuche mit 60 mg/kg der Diäthylmethylverbindung Nr. III wurden nur 6 Tiere gebraucht.

Die Resultate sind in Abb. 1 zusammengefaßt. Es ergab sich, daß in bestimmten Kombinationen deutliche krampfhemmende Wirkungen nachweisbar sind. In den Versuchen mit Procain erfolgt eine maximale Hemmung der Krämpfe nach Vorbehandlung mit der entsprechenden quaternären Äthylverbindung. Die Einführung einer Methylgruppe verringerte die Schutzwirkung mit der geringeren Dosis, sie blieb aber durchaus statistisch gesichert. Mit 60 mg/kg kam es offenbar nicht mehr zu einem antagonistischen Effekt, da hier bereits nicotinartiges Zittern durch die quaternäre Base allein hervorgerufen wurde. Das Dimethylderivat (Nr. IV) hatte keine statistisch sichere Wirkung auf den Eintritt der Krämpfe, doch war deren Stärke und Dauer erheblich vermindert. Mit der Trimethylverbindung war trotz hoher Dosen und guter Verträglichkeit derselben kein Schutzeffekt mehr nachweisbar. Das Dimethylhomologe des Procains wurde nur in Kombination mit den beiden extremen quaternären Basen untersucht. Die Ergebnisse waren entgegengesetzt zu denen mit Procain, nämlich kein Schutz durch die Triäthylverbindung und weitgehende Krampfhemmung durch das Trimethylhomologe. Während die Krampfwirkung des Procains und seines Dimethylhomologs durch ein geeignetes quaternäres Derivat verringert werden konnte, kam es gelegentlich zu einer starken Summierung der lähmenden Komponente beider Verbindungen, die nach mehreren Stunden zum Tode führte.

Diskussion der Ergebnisse.

Beschränken wir uns auf die krampfhemmende Wirkung, so glauben wir, daß Konkurrenzhemmung auf Grund struktur-chemischer Ähnlichkeiten die Ergebnisse am besten erklären kann. Gründe für diese Annahme sind oben kurz erwähnt worden und in der Beschreibung des Antagonismus zwischen dem Procain und seinen Spaltprodukten eingehend beschrieben (Richards u. Kueter).

Eine damals entwickelte, einfache schematische Darstellung der Vorgänge kann nun zwangslos auf die Versuche mit den quaternären Abkömmlingen ausgedehnt werden: Abb. 2. Selbstverständlich handelt es sich dabei um eine weitgehende Vereinfachung sehr komplizierter Vorgänge.

Wir haben hier dem „Receptor", der eine Zelloberfläche, ein Ferment oder ein Substrat sein mag, eine bestimmte Konfiguration zuerteilt und dem Procain eine entsprechende Form, die eine feste Verankerung an diesem „Receptor" erlaubt, ähnlich wie es Emil Fischer und Ehrlich mit den bekannten Schlüssel-Loch-Beispielen gezeigt haben. Kommt es zu dieser Bindung, so treten Krämpfe auf. Wenn nun eine Hälfte des Procainmoleküls, PABA oder DEAE den ihm entsprechenden Teil des Receptors besetzt, kann das Procainmolekül sich nicht mehr verankern. Das Fehlen von Krämpfen und den sogar besseren Schutz, den man durch die gleichzeitige Einspritzung beider Spaltprodukte erzielt, ist dadurch erklärt, daß diesen die Esterbindung fehlt. Dieser Bindung haben wir eine bestimmte willkürliche Konfiguration am Procainmolekül und entsprechenderweise am „Receptor" zugewiesen. Dies mag z. B. in Wirklichkeit der Änderung der Lipoidlöslichkeit, Polarität oder anderer physikalisch chemischer Eigenschaften entsprechen. Wenn so zwei Teile des „Receptors" durch Spaltprodukte besetzt sind, ist die Bindung eines Procainmoleküls noch mehr erschwert. Dies ist auf dem linken Teil der Abb. 2 dargestellt.

Der para-Stellung der Aminogruppe haben wir einen Sporn zugeteilt, der sich an einer entsprechenden Vertiefung des „Receptors" verankert. Die Folgen einer Verschiebung dieser Gruppe sind in dem mittleren Teil der Abb. 2 gezeigt. Wenn der Sporn in die ortho-Stellung verschoben ist, kann das Molekül nicht mehr am „Receptor" haften und die Schutzwirkung fehlt völlig. Wird dagegen die Aminogruppe ganz entfernt, so paßt diese Verbindung in den „Receptor", aber ihre Haftfestigkeit ist verringert, was sich durch eine schwächere Schutzwirkung ausdrückt.

In ähnlicher Weise sehen wir einen Verlust der Krampfhemmung wenn z. B. die Konfiguration der Diäthylsubstitution am Aminoalkohol in die nicht mehr passende Dimethylform geändert wird (Abb. 2 Mitte).

Auf der rechten Seite der Abb. 2 ist die quaternäre Konfiguration durch eine Verlängerung der Aminoalkoholzacke ausgedrückt worden. Infolgedessen paßt das Triäthylderivat des Procains noch grundsätzlich in den „Receptor", doch ist die Anlegung infolge der Modifikation weniger dicht. In der Tat konnten wir ja auch die Krämpfe mit dieser Verbindung auf 13 -14%, mit einer Mischung von PABA und DEAE aber sogar auf 7% reduzieren. Die Veränderung, die durch den zunehmenden Ersatz der Äthyl- durch Methylgruppen am Stickstoff stattfindet, ist entsprechend schematisch dargestellt und findet in den oben beschriebenen Versuches in dem zunehmenden Verlust der Schutzwirkung ihren experimentellen Ausdruck.

Versuche dieser Art konnten von uns am Kaninchen nur gelegentlich, am Hunde nicht wiederholt werden. Ting u. Coon fanden keinen Schutz durch PABA oder DEAE gegen tödliche Procaindosen in Mäusen. Diese Unterschiede sind wenigstens teilweise durch die an sich große Un-

empfindlichkeit der Maus gegen Procain zu erklären, die es unmöglich macht, die dadurch notwendigen noch größeren Mengen von PABA oder DEAE zu verabreichen. Andere Tiere, wie das Kaninchen und der Hund,

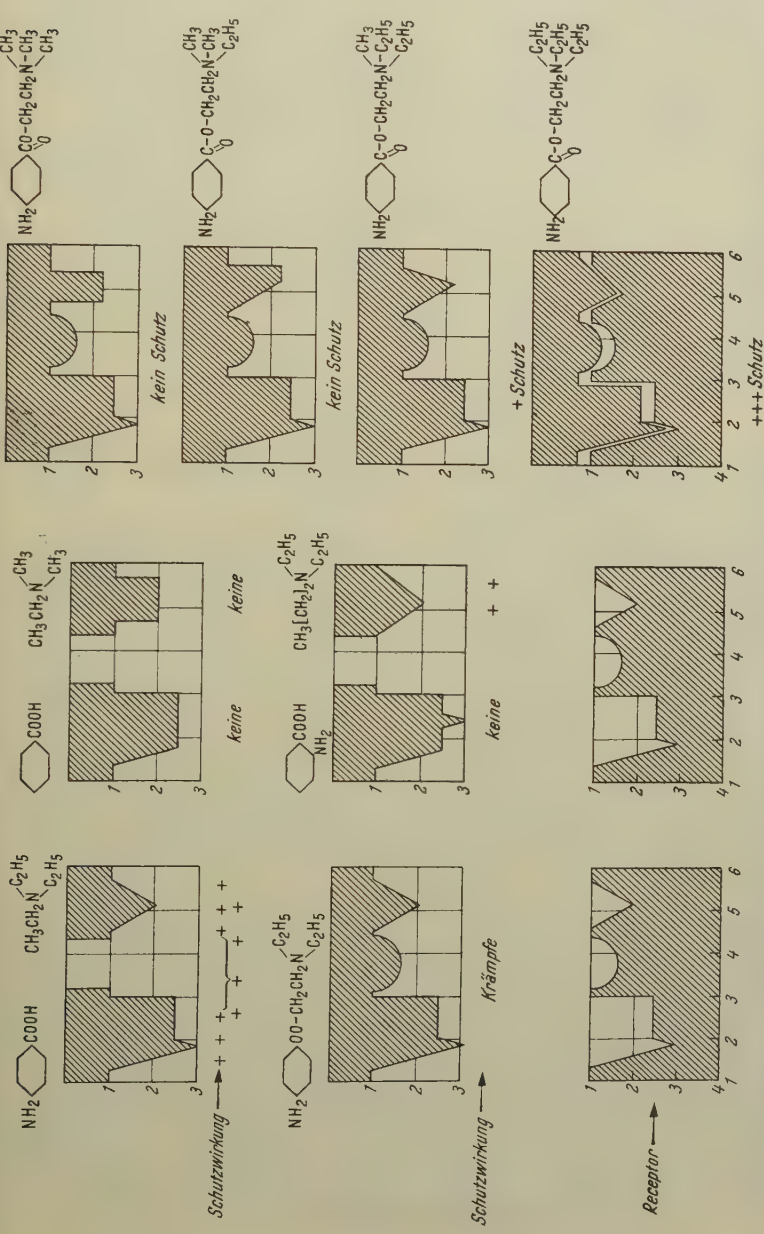


Abb. 2. Bildlich schematische Darstellung der Krampfwirkung des Procains und deren Hemmung durch Vorbehandlung mit dessen Spaltprodukten, verwandten Verbindungen oder quaternären Derivaten. Alle Versuche an Meerschweinchen. Die Stärke der Schutzwirkung ist durch + bis + + + + ausgedrückt. Siehe Text für Einzelheiten.

vertragen DEAE in größeren Dosen schlecht. Außerdem hat in unserer Erfahrung das Meerschweinchen die größte Toleranzbreite gegenüber Procain, innerhalb derer es mit nicht tödlichen Krämpfen ohne starke Depression reagiert, und dieser Antagonismus kann nur innerhalb eines gewissen Wirkungsbereiches demonstriert werden. So weit uns bekannt ist, ist durch diese Versuche zum ersten Male eine zentrale Krampfhemmung durch den spezifischen Wirkungsmechanismus einer Konkurrenzhemmung auf Grund chemischer Strukturähnlichkeiten gedeutet worden. Ist doch trotz eifriger elektrophysiologischer und biochemischer Forschung der unspezifische Antagonismus zwischen Krampfgiften und Sedativen noch im wesentlichen unerklärt geblieben. Von allgemeinem biologischem Interesse scheint uns auch die Tatsache zu sein, daß hier ähnliche Gesetze für das relativ primitive Bacterium wie für die hochentwickelte Nervenzelle gelten, da z. B. in beiden Fällen die Verschiebung der Aminogruppe in der PABA von der para- zur ortho-Stellung die antagonistische Wirkung völlig aufhebt.

Zusammenfassung.

1. Die Ergebnisse unserer vorhergehenden Arbeiten über die hemmende Wirkung der Spaltprodukte des Procains auf die Procainkrämpfe des Meerschweinchens werden kurz besprochen.

2. Einige quaternäre Derivate des Procains und seines Dimethylanaloges werden beschrieben. Sie besitzen keine lokalanästhetische Wirkung, eine größere Giftigkeit als die tertiären Muttersubstanzen und zeigen nicotin- und curareartige Eigenschaften.

3. Vorbehandlung von Meerschweinchen mit bestimmten Vertretern dieser quaternären Verbindungen hemmen die Krampfwirkung der nächstverwandten tertiären Base.

4. Besprechung der Ergebnisse ergibt als beste Deutung dieser Beobachtungen die Annahme einer recht spezifischen Konkurrenzhemmung auf Grund strukturchemischer Ähnlichkeiten. Dies scheint das erste Beispiel eines solchen Mechanismus am Zentralnervensystem zu sein.

Literatur.

Beutner, R.: Anesth. and Analg., N. Y. **19**, 132 (1940). — Hazard, R.: C. r. Soc. Biol. Paris **146**, 684 (1952). — Hazard, R., et E. Corteggiani: C. r. Acad. Sci. Paris **216**, 779 (1943). — Hazard, R. et al.: C. r. Soc. Biol. Paris **145**, 1040 (1951). — Moore, M. B., R. K. Richards and K. E. Kueter: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **68**, 26 (1948). — Richards, R. K.: J. of Biol. Chem. **159**, 241 (1945). — Fed. Proc. **5**, 86 (1946). — J. of Pharmacol. **98**, 27 (1950). — Richards, R. K., and K. E. Kueter: J. of Pharmacol. **87**, 42 (1946). — Richards, R. K., L. W. Roth and K. E. Kueter: Fed. Proc. **6**, 364 (1947). — Ting, K. S., and J. M. Coon: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **76**, 543 (1951). — Woods, D. D.: Brit. J. Exper. Path. **21**, 74 (1940).

Prof. Dr. R. K. Richards, Pharmakol. Abt. der Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois, USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 43—49 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg/Br.
(Direktor: Prof. Dr. S. Janssen).

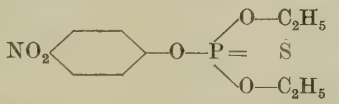
Das Blutbild und die Geschlechtsabhängigkeit bei chronischer Parathionvergiftung*.

Von
A. Enders, G. Körting und D. Weiland.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 16. Januar 1953.)

Das Insekticid Parathion (Paranitrophenyldiäthylthiophosphat)



ist der wirksame Bestandteil der Schädlingsbekämpfungsmittel E 605 und Folidol. Seine auch bei Warmblütern erhebliche Giftwirkung beruht nach Dubois u. Mitarb.[1] und Wirth[8] auf der Cholinesterasehemmung des Parathions. Neben parasympathischen Reizerscheinungen finden sich jedoch bei der Vergiftung Symptome, die durch die Cholinesterasehemmung allein nicht erklärt werden können. In Untersuchungen mit Grupp u. Ruf[2, 3, 5] wiesen wir nach, daß im Organismus ein rascher Zerfall des Parathionmoleküls stattfindet. Dabei entsteht Nitrophenol, diese „sekundäre Giftung" erklärt zahlreiche Erscheinungen am Kreislauf und Zentralnervensystem bei akuter Vergiftung[2, 5]. Auch die chronischen Vergiftungserscheinungen konnten wir[3] mit dem Entstehen von Nitrophenol in Zusammenhang bringen. Nach 4wochenlanger Einatmung von parathionhaltiger Luft wiesen wir im Blut von Ratten Heinzsche Körperchen (als Zeichen einer Blutschädigung) nach. Die nachstehenden Untersuchungen befassen sich mit den chronischen Wirkungen dieser Blutfarbstoffveränderungen auf das rote Blutbild bei der leichter dosierbaren oralen Applikation von Parathion. Da nach Dubois[1] und Frawley[6] weibliche Ratten bei akuter Vergiftung wesentlich empfindlicher sind als männliche Tiere, untersuchten wir gleichzeitig die Giftresistenz beider Geschlechter im chronischen Versuch mit besonderer Berücksichtigung des Genitalzyklus der Weibchen.

* Herrn Professor Dr. O. Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

Methodik.

Als Versuchstiere dienten Ratten, die in Drahtkäfigen bei konstanter Raumtemperatur (23°) gehalten wurden. Sie erhielten ein Standardfutter folgender Zusammensetzung: 500 g Weizenschrot, 500 g Haferflocken, 100 g Trockenmilch, 50 g Lebertran, 10 g Trockenhefe, 20 g McCollum-Salz auf 2 l Wasser.

Parathion wurde in verdünnten Stammlösungen des Präparates E 605 forte (Bayer) mit dem Futter vermischt verabreicht. Da mit Parathion gefütterte Ratten freßunlustig werden, gaben wir nach entsprechenden Vorversuchen nur 200—400 g Futterbrei pro Kilogramm Ratte. Diese Menge fraßen auch die chronisch vergifteten Tiere restlos auf, wodurch eine quantitative Aufnahme des verfütterten Parathions gesichert war. Auf diese Art konnten die gegenüber den Kontrolltieren eintretenden Gewichtsverluste sicher auf das verabreichte Gift zurückgeführt werden, während sie sonst auch indirekt — durch Appetitminderung und die damit verbundene geringere Nahrungsaufnahme — hätten verursacht werden können. Vorweggenommen sei die Beobachtung, daß bei den mit den gleichen knappen Nahrungsmengen ernährten Kontrollen niemals krankhafte Erscheinungen auftraten.

Bei der Blutentnahme bewährte sich das von Enders und Moench[4] beschriebene Gestell zur Prüfung percutaner Toxicität. Die Fixierung der Ratten in den modellierbaren Drahtkäfigen ermöglicht ein ungestörtes Arbeiten an den frei heraushängenden Schwänzen der Tiere. Die Zählung der Erythrocyten, die Bestimmung des Hämoglobingehaltes nach Sahli und die Untersuchung des Vaginalabstriches bei den weiblichen Tieren erfolgte in üblicher Weise. — Kobalt- und Vitamin B_{12}-Lösungen wurden subcutan injiziert. — Die Retikulocytenfärbung erfolgte mit Brillantkresylblau.

Ergebnisse.

In mehreren Vorversuchen stellten wir die Menge Parathion fest, die bei 4wochenlanger Verfütterung von den Ratten vertragen wird (Futtermenge: 400 g/kg). Am günstigsten erwies sich dabei, 5 Tage lang eine Menge von 4 mg/kg zu verabreichen und in den folgenden 3 Wochen die Dosis alle 3 Tage um 1 mg bis zu 10 mg/kg zu steigern. Die letztere Dosis verursachte motorische Reizzustände (Tremor), die aber bis zum Ende des Versuches überstanden wurden. Die Ratten zeigten eine

Tabelle 1. *Das rote Blutbild bei 8 parathion-vergifteten Ratten:* Dosis: 4 mg/kg—10 mg/kg per os.

	Hämoglobin (g)		Erythrocyten (Mill.)	
	Anfangswert	Endwert	Anfangswert	Endwert
	15,2	13,1	7,7	7,0
	15,1	13,3	7,3	6,8
	14,4	12,0	7,7	6,4
	13,8	12,0	8,2	7,4
	14,4	11,2	8,5	5,6
	13,9	12,5	8,2	7,5
	13,8	10,4	7,5	6,8
	13,3	12,0	7,3	6,4
Durchschnitt:	14,2	12,1	7,8	6,7

Gewichtsabnahme um durchschnittlich 25% des Anfangsgewichtes. Tab. 1 gibt eine Übersicht über die Veränderungen des roten Blubildes während der 4wöchentlichen Vergiftung.

Bei allen 8 Ratten bildete sich während der Parathionvergiftung eine Anämie aus, während die Hämoglobin- und Erythrocytenwerte bei den Kontrolltieren jeweils konstant blieben. Im Anschluß an diese Untersuchungen stellten wir die Veränderungen des Blutbildes bei Verwendung der niedrigeren Dosis von 5 mg/kg während 4 Wochen fest. Aus Tab. 2 geht hervor, daß sich bei 13 Ratten mit einer Ausnahme keine Anämie ausbildete, sondern daß die Erythrocyten- und Hämoglobinwerte leicht anstiegen:

Tabelle 2. *Das rote Blutbild bei 13 parathion-vergifteten Ratten:* Dosis: 5 mg/kg per os.

	Hämoglobin (g)		Erythrocyten (Mill.)	
	Anfangswert	Endwert	Anfangswert	Endwert
	14,1	13,6	7,4	7,7
	11,2	12,7	6,1	7,5
	10,6	12,0	6,2	7,6
	12,5	13,6	6,4	7,6
	13,5	15,2	7,7	7,6
	13,0	13,6	7,4	7,7
	12,8	13,9	7,3	7,9
	13,3	13,5	6,1	7,0
	12,6	13,9	7,2	8,6
	13,5	14,7	6,7	9,0
	14,1	14,4	7,4	8,4
	12,8	13,6	7,6	8,4
	13,1	13,9	7,0	8,3
Durchschnitt:	12,9	13,7	7,0	7,9

Bei denselben Tieren wurde danach während 4 Wochen die Dosis von 10 mg/kg verfüttert, was eine ähnliche Verminderung der Erythrocyten- und Hämoglobinwerte wie in der ersten Serie zur Folge hatte.

In einer weiteren Versuchsserie wurden 24 Ratten mit einer täglichen Parathionmenge von 5 mg/kg vergiftet und außer den Erythrocyten- und Hämoglobinwerten wöchentlich die Reticulocytenzahlen bestimmt. Sie zeigten bei allen Tieren nach 3 Wochen eine Zunahme. (Zahlenangaben in Promill der Erythocytenwerte!)

Anfangswerte: 14; 19; 15; 20; 16; 18; 15; 21; 17; 20; 16; 13; 26; 11; 15; 11; 21; 12; 17; 21; 14; 27; 22; 11.

Endwerte: 22; 25; 23; 28; 17; 18; 16; 32; 32; 27; 31; 18; 26; 28; 22; 20; 31; 13; 34; 29; 20; 31; 25; 21.

Die durchschnittliche Zunahme betrug: + 8 (von 17 auf 25). Anschließend wurde bei einer Reihe von Versuchstieren die durch Parathion erzeugte Anämie mit Kobalt und Vitamin B 12 erfolgreich behandelt*.

Während einer 4wöchigen Parathionvergiftung, bei der die Parathion-Dosen bis 12 mg/kg bei gleichzeitiger Verabreichung von 0,3 mg/kg Kobalt gesteigert wurden, ergab sich eine Erhöhung der Hämoglobinwerte von 14,1 auf 15,1 g, der Erythrocytenwerte von 8 auf 9,2 Millionen. Eine etwas geringere Wirkung hatte die Zufuhr von 0,15 γ/kg Vitamin B 12; hier stiegen die Hb-Werte von 13,5 auf 13,9 g, die Erythrocytenwerte von 7,4 auf 7,8 Millionen. Die Differenz der Hämoglobin- und Erythrocytenwerte bei unbehandelter Parathionvergiftung einerseits und bei gleichzeitiger Therapie andererseits waren statistisch signifikant:

Hämoglobinwerte:

Durchschnittl. Diff. Parath. u. Parath. mit Kobalt:	3,1 g ± 0,36
„ „ „ u. Parath. mit Vit. B 12	2,9 g ± 0,34

Erythrocytenwerte:

Durchschnittl. Diff. Parath. u. Parath. mit Kobalt:	2,4 Mill. ± 0,04
„ „ „ u. Parath. mit Vit. B 12	1,4 Mill. ± 0,31

Bei der Kobaltbehandlung zeigte sich außer der günstigeren Beeinflussung des Blutbildes auch ein wesentlich besseres Allgemeinbefinden der Tiere. Objektiv konnte gesteigerte Freßlust und dementsprechend Gewichtsanstieg beobachtet werden. Die gleichzeitige Verabreichung von Parathion und Kobalt oder Parathion und Vitamin B 12 verhinderte auch das Auftreten motorischer Reizerscheinungen.

Die geschlechtsabhängige Empfindlichkeit bei akuter Parathionvergiftung veranlaßte uns, dasselbe Phänomen bei chronischer Applikation zu studieren. Je 15 weibliche und männliche Ratten erhielten während 4 Wochen 5 mg/kg Parathion per os, danach wurde die Dosis jede Woche um das 1½fache, also auf 7,5 mg, 12 mg, 18 mg usw. gesteigert. In dieser Zeit trat Freßunlust nur bei den Weibchen auf. Während diese ihr Futter erst 18—22 Std nach der Fütterung ganz aufgefressen hatten, fraßen die Männchen ihr Futter stets innerhalb 3 bis 4 Std. (Allen Tieren wurde die gleiche Futtermenge pro Kilogramm Körpergewicht zugeteilt.) Bei den Weibchen nahm die Freßunlust gegen Ende der Vergiftungsperiode zu, so daß die täglichen Futtermengen bei beiden Versuchsgruppen auf 200 g/kg eingeschränkt werden mußten. Kontrolltiere, die die gleiche Futtermenge ohne Parathion erhielten, zeigten außer Gewichtsabnahme keine krankhaften Erscheinungen.

* Für die Überlassung von „Cobalt-Nordmark“ und „Cytobion“ danken wir den Firmen Nordmark und Merck.

Bei dieser Parathionvergiftung mit allmählicher Steigerung der Dosen von 4 mg auf 60 mg/kg war die Resistenz der Männchen erheblich *geringer* als die der Weibchen. Abb. 1 zeigt, daß letztere erst bei wesentlich höheren Dosen starben. Die durchschnittliche Differenz der Überlebensdauer von Männchen und Weibchen ist signifikant und beträgt (in Wochen) $1{,}3 \pm 0{,}29$.

Da der Tod der Ratten nicht am Tage der Steigerung der Parathiondosis auftrat, sondern meist erst zu beobachten war, nachdem die Tiere einige Tage die höhere Dosis bekommen hatten, konnte eine akute Vergiftung ausgeschlossen werden.

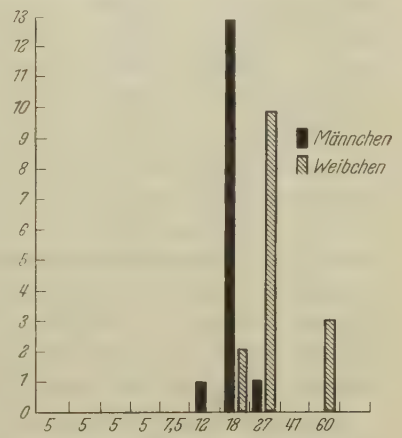


Abb. 1. Die Letalität von männlichen und weiblichen Ratten bei chronischer Parathionvergiftung. Ordinate: Zahl der in der jeweiligen Vergiftungsperiode gestorbenen Ratten. Abszisse: Parathiondosis (in mg pro Kilogramm und Tag) während einer Woche.

Bei Dosen über 5 mg/kg wurden Zyklusstörungen beobachtet. Es trat kein Östrus mehr auf, im Vaginalabstrich fand sich nur noch schleimiges Sekret mit Leukocyten und kernhaltigen Zellen. Da der Tod der weiblichen Ratten erst bei wesentlich höheren Dosen erfolgte, kann die Unfähigkeit der Tiere, einen normalen Östrus zu produzieren, nicht nur als Folge einer höhergradigen Allgemeinschädigung aufgefaßt werden.

Die histologische Untersuchung der Ovarien zeigte zahlreiche große Corpora lutea neben unreifen Follikeln. Besonders auffällig waren gelbliche, extracelluläre Ablagerungen im interstitiellen Bindegewebe; sie fanden sich vor allem perivasculär. Durch Berlinerblaufärbung konnten diese Ablagerungen als Hämosiderin identifiziert werden.

Besprechung.

Eine 4 Wochen dauernde orale Verabreichung von 10 mg/kg Parathion bewirkt bei Ratten eine ausgeprägte Anämie. Sie kann als Folge der Blutfarbstoffveränderung (Hämiglobinbildung) durch das im Organismus aus Parathion entstehende Nitrophenol gedeutet werden. Im Gegensatz dazu verursachten kleinere Dosen von 5 mg/kg eine Zunahme der Hämoglobin- und Erythrocytenwerte. Die gleichzeitige Vermehrung der Reticulocyten erlaubt den Schluß, daß es sich bei dieser anfänglichen Verbesserung des roten Blutbildes um eine Reizung des Knochenmarks, um eine überschießende Kompensation des Erythrocytenzerfalls handelt. Höhere Dosen Parathion schädigen dann das Knochenmark selbst oder

bewirken zum mindesten, daß auch eine gesteigerte Neubildung von Erythrocyten den unverhältnismäßig stärkeren toxischen Zerfall nicht auszugleichen vermag. Die histologische Untersuchung der Ovarien zeigte massige Hämosiderinablagerungen als Zeichen dieses Blutzerfalles.

Wirth und Hecht[7] vermißten histologische Befunde, gaben jedoch wesentlich geringere Dosen Parathion (54 mg/kg in 3½ Wochen an Katzen gegenüber 580 mg/kg in 8 Wochen an Ratten in unseren Versuchen).

Durch Kobalt und Vitamin B 12 gelingt die therapeutische Beeinflussung dieser toxischen Anämie, wodurch auch die übrigen krankhaften Erscheinungen der Tiere gebessert werden. Somit muß das schlechte Allgemeinbefinden mindestens teilweise als Folge der Blutveränderungen aufgefaßt werden.

Während Frawley[6] bei akuter oraler Parathionvergiftung für Männchen eine LD 50 von 30 mg/kg, für weibliche Ratten eine LD 50 von 3 mg ermittelte, erwiesen sich bei unseren chronischen Vergiftungsversuchen mit langsamer Steigerung der Dosis von 4 auf 60 mg/kg die weiblichen Tiere resistenter als die Männchen. Angesichts dieser geringeren Empfindlichkeit der weiblichen Tiere ist es umso bemerkenswerter, daß die Freßlust der Weibchen stärker als bei den Männchen eingeschränkt wird. Der Grad der Appetitstörung geht also bei dieser chronischen Vergiftung nicht parallel der Allgemeinschädigung.

Da nach unserer Ansicht bei akuter Vergiftung die Cholinesterasehemmungswirkung vorherrscht, während bei chronischer Vergiftung die sekundäre Entstehung von Nitrophenol die größere Rolle spielt, bildet das unterschiedliche Verhalten der Geschlechter bei akuter und chronischer Parathionvergiftung einen weiteren Hinweis auf den zweigleisigen Mechanismus dieser Intoxikation.

Die Verwendung des Parathions in der Schädlingsbekämpfung legt es nahe, bei entsprechenden Berufserkrankungen auch an hämatologische Störungen oder sogar an Erkrankungen des Genitalapparates zu denken.

Zusammenfassung.

4 Wochen lange orale Verabreichung von Parathion in Dosen bis 10 mg/kg erzeugt bei Ratten eine Verminderung der Erythrocytenzahl und des Hämoglobingehaltes.

Durch Kobalt und Vitamin B 12 gelingt die therapeutische Beeinflussung der durch Parathion hervorgerufenen Anämie.

Dosen von 5 mg/kg bewirken einen leichten Anstieg der Erythrocyten- und Hämoglobinwerte. Die gleichzeitige Vermehrung der Reticulocyten läßt diesen Vorgang als anfängliche „reaktive Überleistung“ (Katsch) erscheinen.

Im Gegensatz zur akuten Parathionvergiftung erweisen sich bei der chronischen Parathionvergiftung weibliche Ratten resistenter als Männchen.

Bei der chronischen Parathionvergiftung treten bei der weiblichen Ratte Zyklusstörungen auf. Die histologische Untersuchung der Ovarien zeigt u. a. verbreitete Hämosiderinablagerungen als Zeichen eines Blutzerfalles.

Literatur.

[1] Dubois, K. P., J. Doull, P. R. Salerno a. J. M. Coon: J. of Pharmacol. **95**, 76 (1949). — [2] Enders, A.: Arch. internat. Pharmacodynamie **89**, 169 (1952). [3] Enders, A., u. G. Grupp: Arzneimittelforschung **1**, 79 (1951). — [4] Enders, A., u. A. Moench: Arzneimittelforschung **2**, 587 (1952). — [5] Enders, A., u. H. Ruf: Arch. internat. Pharmacodynamie **90**, 174 (1952). — [6] Frawley, J. P., E. C. Hagan, O. G. Fitzhugh: J. of Pharmacol. **105**, 156 (1952). — [7] Hecht, G., u. W. Wirth: Arch. exper. Path. u .Pharmakol. **211**, 264 (1950). — [8] Wirth, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 547 (1949).

Dr. A. Enders, Pharmakolog. Institut d. Univ. Freiburg/Br.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 50—56 (1953).

Aus der Abteilung für experimentelle Therapie an der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg i. Br. (Leiter: Dozent Dr. Peter Marquardt).

Wirkungsunterschiede zwischen dem Acetylester des Cholins und dem des Thiocholins*.

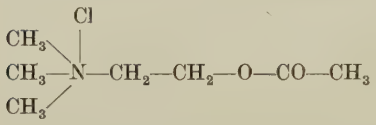
Von

Peter Marquardt und Georg Vogg.

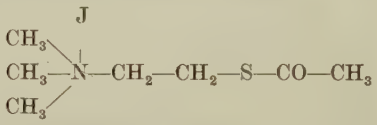
Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. Dezember 1952.)

Nachdem die Untersuchungen von Lynen[5] über Acetyl-Coenzym A gezeigt haben, daß es sich hierbei chemisch um Acylmercaptane handelt, also um relativ beständige Verbindungen (Wieland[9]) mit hohem Energiegehalt, lag es nahe, den Acetylthioester des Cholins (ACS) mit Acetylcholin (AC) vergleichend pharmakologisch zu untersuchen.



Acetylcholin (AC)



Acetylthiocholin (ACS)

Das Acetylthiocholin** wurde im Zusammenhang mit anderen Thiolverbindungen 1938 von Renshaw, Dreisbach, Ziff u. Green[8] als Jodid erstmalig dargestellt und vor allem unter chemischen Gesichts-

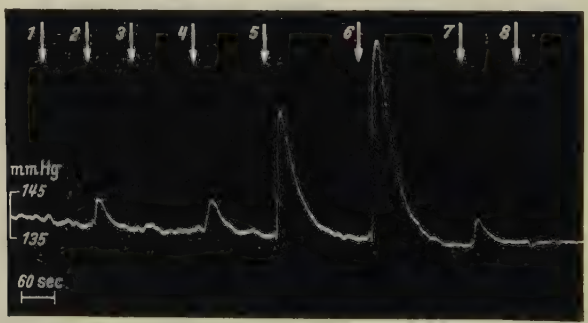


Abb. 1. Katze weiblich. 1,1 kg. Narkose: 5 cm³ Pernocton 1:5 i. p. 1,5 cm³ Thrombo-Vetren 10 mg Atropin/kg. *1* 0,5 cm³ AC 1×10^{-6}; *2* 0,5 cm³ Adrenalin 1×10^{-5}; *3* 0,5 cm³ ACS 1×10^{-5}; *4* 0,25 cm³ ACS 1×10^{-4}; *5* 0,5 cm³ ACS 1×10^{-4}; *6* 1,0 cm³ ACS 1×10^{-4}; *7* 0,5 cm³ Adrenalin 1×10^{-5}; *8* 0,5 cm³ AC 1×10^{-6}.

* Herrn Professor Dr. Loewi in New York zum 80. Geburtstag gewidmet.

** Der Firma Hoffmann La Roche und Cie, rue de Crillon, Paris, die diese Substanz in ihrer Reagenzienabteilung „Biochemica Roche" handelt, haben wir für die Überlassung zu danken.

punkten untersucht. Die pharmakologischen Prüfungen dieser Autoren[8] waren nur orientierend und ergaben damals in mittleren Dosen einen geringen, atropinisierbaren Blutdruckabfall mit einer nachfolgenden massiven Steigerung, die nach Adrenalektomie kürzer und geringer in Erscheinung trat.

Unsere Untersuchungen ergaben, daß die Substanz in niedrigen Dosen eine blutdrucksenkende, atropinisierbare, also AC-ähnliche Wirkung auslöst. Mit Steigerung der Dosis tritt nach kurzfristiger anfänglicher Senkung eine markante Blutdrucksteigerung auf, deren Ablauf sich von dem einer Adrenalininjektion nicht unterscheidet. Atropingabe löscht die anfängliche Senkung aus und läßt die anschließende Steigerung etwas stärker in Erscheinung treten (Abb. 1).

Man hat demnach den Eindruck, daß nach der Substitution des Sauerstoffs durch Schwefel die sogenannte „nicotinartige" Nebenwirkung des AC zur Hauptwirkung wird und die Hauptwirkung des AC, nämlich die kurzfristige Blutdrucksenkung („muscarinartige" Wirkung), zur Nebenwirkung herabsinkt. Die folgende Kurve, die unter den Bedingungen aufgenommen wurde, die zur Darstellung der „nicotinartigen" Wirkung des AC in der Pharmakologie üblich sind, also hohe Dosen AC nach Atropinisierung, möge dieses Verhalten illustrieren (Abb. 2). Die starke, gleichzeitig mitregistrierte atmungsstimulierende Wirkung des ACS (Abb. 2), die in gewissem Gegensatz zum AC steht, tritt in hohen und niedrigen Dosen regelmäßig auf.

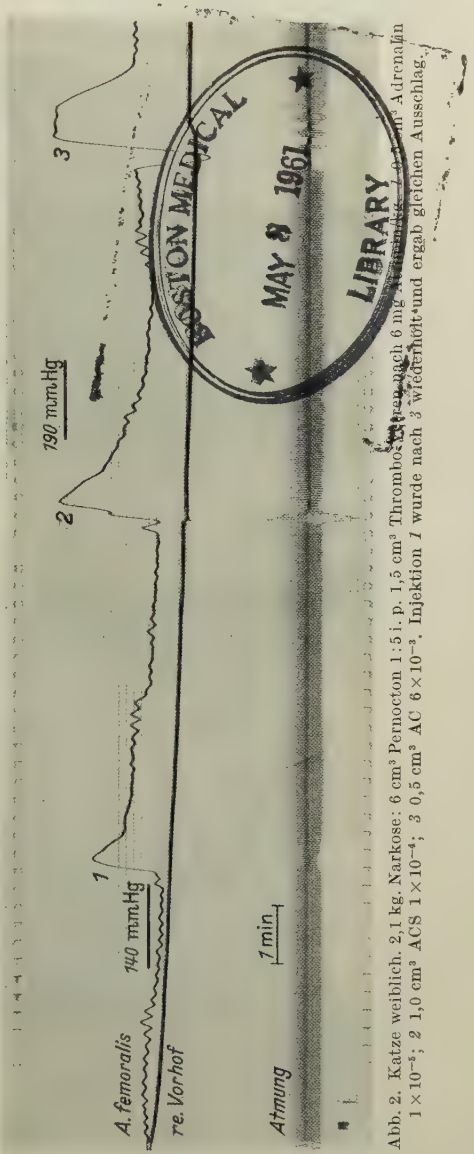


Abb. 2. Katze weiblich. 2,1 kg. Narkose: 6 cm³ Pernocton 1:5 i. p. 1,5 cm³ Thrombozytenextrakt nach 6 mg Atropinsulfat 1 cm³ Adrenalin 1×10^{-3}; 2 1,0 cm³ ACS 1×10^{-4}; 3 0,5 cm³ AC 6×10^{-3}. Injektion *1* wurde nach 3 wiederholt und ergab gleichen Ausschlag.

An dieser Stelle muß kurz auf die Dosen eingegangen werden, um den Ausdruck „hohe" und „niedrige" Dosen zu präzisieren. Vom AC muß man etwa 0,05 γ/kg und vom ACS etwa 5 γ/kg i. v. injizieren, um von beiden Substanzen eine rein depressorische Wirkung etwa gleicher Größenordnung zu erhalten. Nach massiver

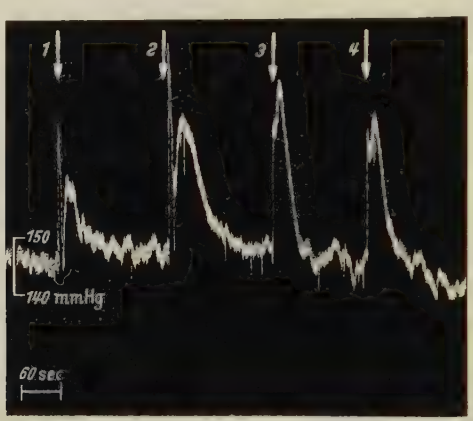


Abb. 3a. Katze weiblich. 3,2 kg. Narkose: 5 cm³ Pernocton 1:5 i. p.; 1,5 cm³ Pernocton 1:5 i. m.; 1,0 cm³ Pernocton 1:5 i. v.; 1,5 cm³ Thrombo-Vetren. *1* 0,5 cm³ ACS 1×10^{-4}; *2* 1,0 cm³ ACS 1×10^{-4}; *3* 0,2 cm³ Adrenalin 1×10^{-4}; *4* 1,0 cm³ Adrenalin 1×10^{-5}.

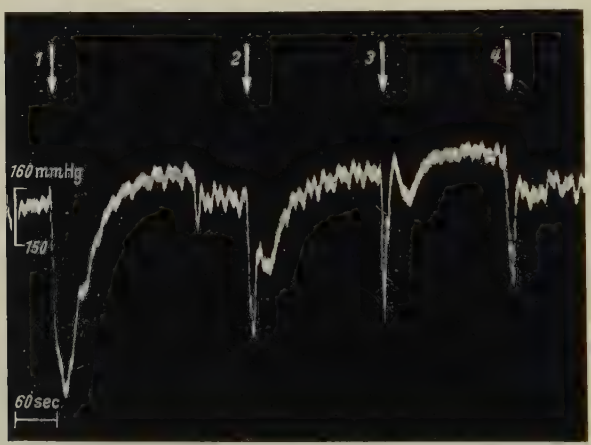


Abb. 3b. Gleiche Katze in gleicher Versuchsanordnung wie in Abb. 3a nach 2 mg Regitin/kg Katze. *1* 1,0 cm³ Adrenalin 1×10^{-5}; *2* 0,5 cm³ ACS 1×10^{-4}; *3* 1,0 cm³ ACS 1×10^{-4}; *4* 0,5 cm³ ACS 1×10^{-4}.

Atropinvorbehandlung (5—10 mg/kg) muß man 1,5—2,5 mg AC/kg injizieren, um etwa gleich große, blutdrucksteigernde Wirkungen zu erhalten, wie wir sie bei 50 γ ACS/kg, selbstverständlich ohne Atropinvorbehandlung, regelmäßig sehen. Unter dem Vorbehalt der bekannten erheblichen Streuung der AC-Wirkung am Blutdruck entsprechen diese durchschnittlichen Werte unseren Ergebnissen an insgesamt 20 Katzen.

Bekanntlich führt man das Auftreten der „nicotinartigen" AC-Wirkung auf eine Ausschüttung pressorischer Substanzen aus der Nebenniere zurück. Es wurden daher die Versuche am beidseitig adrenalektomierten Tier wiederholt. Hier zeigt es sich, daß nach Adrenalektomie in der Mehrzahl unserer Versuche die kurzfristig blutdrucksenkende Wirkung des ACS erhalten war, während die massive anschließende Blutdrucksteigerung ausblieb. Nur in einem unserer Versuche, in dem wir ACS sofort nach der Operation injizierten, während sonst stets 30 bis 45 min gewartet wurde, erhielten wir den gleichen Befund der Abkürzung und Abschwächung wie Renshaw u. Mitarb.[8]. Wir möchten diese Differenz schon deshalb nicht werten, weil verstreutes, chromaffines Gewebe die Befunde nach Adrenalektomie uneinheitlich gestalten kann und weil auch die Dosierung die Stärke der Reaktion beeinflußt. Wir hielten es daher für notwendig, die Ausschüttung pressorischer Substanzen durch ACS noch auf anderen Wegen experimentell zu stützen.

Abb. 4. Katze weiblich. 2,3 kg. Narkose: 7,5 cm³ Chloralose-Urethan, 2,0 cm³ Xylanester Boehringer. *1* 0,5 cm³ Adrenalin 1×10^{-5}; *2* 1,0 cm³ ACS 1×10^{-4}; *3* 0,2 cm³ NaCl 0,9%; *4* 0,5 cm³ Arterenol 1×10^{-5}.

Deshalb wurde die Wirkung des ACS vor und nach Gabe des Sympathicolyticums Regitin (2- [(N-p-Tolyl-N-m-oxy-phenyl-aminomethyl]imidazolin) untersucht. Wie Abb. 3a und 3b zeigen, wird die ACS-Wirkung auf den Blutdruck durch Regitin in gleicher Weise umgekehrt, wie die Adrenalinwirkung*. In Analogie zum Adrenalin wurde durch Regitin auch die Wirkung des ACS auf die Atmung nicht beeinflußt.

Weiter wirkt ACS an Tieren, die auf mittlere Dosen von Adrenalin (5 Gamma) ohne Vorbehandlung mit einem Sympathicolyticum mit einer Blutdrucksenkung, also einer „Umkehr" antworten, wie dieses blutdrucksenkend. Als Beispiel möge ein Versuch angeführt werden: Auf 5 Gamma Arterenol, massive Blutdrucksteigerung (44 mm Hg), auf 5 Gamma Adrenalin massive Blutdrucksenkung (54 mm Hg), auf 100 Gamma ACS ebenfalls Blutdrucksenkung (34 mm Hg) (siehe Abb. 4).

Durch diese Befunde wird nicht nur die Ausschüttung pressorischer Substanzen nach ACS-Gabe erhärtet, sondern darüber hinaus noch

* Der Ausdruck „Adrenalinumkehr" wird verwendet, weil er sich im Schrifttum eingebürgert hat. Mit der Problematik dieses Vorganges haben wir uns an anderer Stelle beschäftigt[4, 6, 7].

gezeigt, daß es sich wohl im wesentlichen um eine Adrenalinausschüttung handeln muß.

Weiter wurde das ACS noch unter den Bedingungen geprüft, unter denen Meier u. Bein[3] die Wirkung des Pendiomids auf die Hemmung der „nicotinähnlichen Wirkungskomponente des AC" untersuchten. In dieser Anordnung wird nach Atropingabe die ganglionäre Erregung, also die „nicotinartige" Wirkung hoher AC-Dosen, durch die Pendiomidvorbehandlung unterdrückt. Eine Wiederholung des Versuches von Meier u. Bein, nur mit dem Unterschied, daß außer AC noch ACS gegeben wurde, ergab ausreichende Übereinstimmung, d. h. direkt nach Pendiomidgabe wird die blutdrucksteigernde Wirkung des AC und auch des ACS fast vollkommen unterdrückt. Im Verlauf von etwa 2 Std erlangen beide Substanzen langsam wieder ihre ursprüngliche Wirkungsstärke und zwar das ACS etwas schneller als das AC.

Abb. 5. Katze weiblich. 2,1 kg. Narkose: 5 cm³ Pernocton 1:5 i. p. 2 cm³ Xylanester Boehringer. Nach Decapitation und Rückenmarkausbohrung unter Arterenolinfusion (1,13 cm³ Arterenol 2×10^{-5} pro Minute). *1* 1,0 cm³ ACS 1×10^{-4}; *2* 0,5 cm³ Adrenalin 1×10^{-5}.

Nach Decapitation und Rückenmarkausbohrung bleibt das Wirkungsbild des ACS erhalten. Die anfängliche Depression ist bei dem tiefen Blutdruck unterdrückt. Sie tritt aber nach Wiederherstellung des ursprünglichen Blutdruckniveaus durch eine Arterenolinfusion etwa in der alten Stärke wieder auf (Abb. 5). Die ACS-Wirkung wird also durch Decapitation und Rückenmarkausbohrung nicht wesentlich beeinflußt.

Es ist üblich, die Wirkung des AC auch am isolierten Kaninchendarm oder am Rückenmuskel des Blutegels zu untersuchen. ACS wirkt in der üblichen Anordnung auf das isolierte Darmstück erregend wie AC, nur hält seine Wirkung länger an.

So erhält man z. B. bei Gabe von 0,5 Gamma AC und 50 Gamma ACS gleiche Tonussteigerung, die im Falle des AC nach etwa 60 min abgeklungen ist, während sie nach ACS-Gabe über 3 Std anhält. Die Wirkung des ACS ist wie die des AC vollkommen atropinisierbar.

Dieser Befund war bei der eingangs angeführten, relativ großen Beständigkeit der Thioester[9] zu erwarten. Er steht aber in gewissem Gegensatz zu der flüchtigen, depressorischen Blutdruckwirkung, nach der die gleiche, schnelle enzymatische Hydrolyse wie bei AC erwartet werden mußte.

Da nun die Anwendung am isolierten Darm es ermöglicht, in bequemer Weise die Wirkung der Esterasen auf das AC zu überprüfen, ließen wir zur Klärung dieses Widerspruchs die spezifische und die unspezifische Esterase auf AC und ACS 12 Std einwirken*. Hierbei ergab sich, daß das ACS entsprechend seinen chemischen Eigenschaften von der spezifischen Esterase wesentlich geringer angegriffen wird als das AC. Dies erklärt vollkommen die lang anhaltende Tonussteigerung am isolierten Darmstück. Im Blutdruckversuch hingegen wirkt das AC nicht direkt auf die Zellen ein, sondern wird erst im Blut „verteilt". Das Serum enthält außerdem nicht die spezifische, sondern die unspezifische Acetylcholinesterase. Läßt man nun Serum auf AC und ACS einwirken (1 cm^3 AC 1 $\times 10^{-6}$ mit 1 cm^3 menschlichem Serum über 12 Std inkubiert), so werden beide Substanzen mit etwa gleicher Geschwindigkeit zerstört. Das unterschiedliche Verhalten des ACS am isolierten Darm und am Ganztier findet somit eine befriedigende Erklärung.

Darüber hinaus wird die Berechtigung einer Einteilung der Acetylcholinesterasen in „spezifische" und „unspezifische" gestützt**.

Das Studium von Fermenteinwirkungen auf AC (bzw. ACS) am isolierten Darm ist nach unserer Ansicht nur beweisend, wenn markante Unterschiede beobachtet werden können, wie es bei uns der Fall war. Wir haben vor, die Fermenteinwirkung auf ACS noch in der Anordnung nach Ammon[1] zu überprüfen. Diese erlaubt auch geringere Differenzen zu werten. Zur Zeit arbeiten wir an der Darstellung anderer Thioester des Cholins. Im Zusammenhang mit der pharmakologischen Untersuchung dieser Körper werden wir diese Methodik vergleichend anwenden.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß die Substitution des Sauerstoffatoms in der Esterbrücke des Acetylcholins durch Schwefel die „muscarinartige" Hauptwirkung des Acetylcholins verringert und die „nicotinartige" Nebenwirkung zur Hauptwirkung des Acetylthiocholins werden läßt.

Das Acetylthiocholin wird von der „spezifischen" Esterase aus Blutkörperchen wesentlich langsamer hydrolysiert als das Acetylcholin. Die „unspezifische" Serumesterase verseift beide Substanzen unter den gewählten Bedingungen mit etwa gleicher Geschwindigkeit.

* In diesen Versuchen wurde spezifische Esterase Nr. N 641 DD (Sterling Winthrop) verwendet, für deren Überlassung wir der Firma Boehringer und Söhne in Mannheim zu Dank verpflichtet sind. Die Esterase wurde stets im Überschuß zugesetzt.

** Auf die Literatur, die die Unterschiede zwischen spezifischer und unspezifischer Acetylcholinesterase und ihr Vorkommen behandelt, kann hier nicht eingegangen werden. Es sei auf die zusammenfassende Darstellung Augustinssons[2] verwiesen.

Literatur.

[1] Ammon, R.: Pflügers Arch. **233**, 486 (1933). — [2] Augustinsson, K. B.: Acta physiol. Scand. **15**, Suppl. 52, (1948). — [3] Bein, H. J., u. R. Meier: Schweiz. med. Wschr. **81**, 446 (1951). — [4] Hildebrand, G., u. P. Marquardt: Arch. internat. Pharmacodynamie **82**, 500 (1950). — [5] Lynen, F., E. Reichert u. L. Rueff: Liebigs Annalen **574**, 1 (1951). — [6] Marquardt, P.: Z. Vitamin-, Hormon-, Ferm.-forschg. Wien **3**, 506 (1950). — [7] Marquardt, P.: Rev. méd. Córdoba **38**, 405 (1950). — [8] Renshaw, Dreisbach, Ziff u. Green: J. Amer. Chem. Soc. **60**, 1765 (1938). — [9] Wieland, Th., W. Schäfer u. E. Bokelmann: Liebigs Annalen **573**, 2 (1951).

Dozent Dr. Peter Marquardt, Freiburg i.Br.,
Abt. f. exper. Therapie an der Med. Fakultät.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 57—63 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Münster i. W.
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. A. Loeser).

Untersuchungen zur diuretischen Wirkung mehrwertiger Alkohole*.

Von

Gerhard Bornmann und Klaus Ritter.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. Februar 1953.)

In eigenen Versuchen mit Glycerin, 1,3-Butandiol und anderen mehrwertigen Alkoholen wurde bei den Versuchstieren nach oraler Zufuhr dieser Substanzen eine Harnflut beobachtet. Vom Glycerin ist ein derartiger Effekt bereits 1876 von Ustimowitsch[13] mitgeteilt und in der Zwischenzeit mehrfach bestätigt worden; auf die nach oraler Verabfolgung von 1,2-Propylenglykol und Diäthylenglykol eintretende Diurese wiesen van Winkle[15] bzw. Laug[9] u. Mitarb. hin. Der Frage, ob den mehrwertigen Alkoholen im allgemeinen eine diuretische Wirkung eigen ist, und in welchem Grade die geprüften Verbindungen dieser Stoffklasse, nämlich Äthandiol, 1,2-Propandiol, 1,3-Butandiol, Glycerin, 1,2,4-Butantriol sowie der Äther-Alkohol Diäthylenglykol wirksam sind, wurde in Versuchen an männlichen Ratten nachgegangen.

Methodisches.

Die mehrwertigen Alkohole wurden in allen Versuchen oral (Schlundsonde) zugeführt, da sich in Vorversuchen ergeben hatte, daß nach ihrer parenteralen Verabreichung eine akute, erhebliche Vermehrung der Harnmenge ausblieb, ein Befund, der gut mit einer Beobachtung von Ustimowitsch bei Prüfung von Glycerin und der Mitteilung von Ginsberg[7] über die stärkere Diurese nach oraler als nach parenteraler Wasserzufuhr harmoniert.

Die 12 Std vor Beginn des Versuches und während seines Ablaufes hungernden und durstenden Ratten erhielten je 100 g Körpergewicht 0,5 bzw. 1,0 cm^3 der zu prüfenden Alkohole. Diese wurden entweder unverdünnt oder verdünnt angewandt. Von den durch Verdünnung mit destilliertem Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung hergestellten 10- bzw. 20%igen Lösungen wurden 5 cm^3 je 100 g Körpergewicht mit der Schlundsonde verabfolgt. Die Lösungen waren demnach so eingestellt, daß gleiche Mengen Glykol geprüft wurden wie in den Versuchen mit unverdünnten Substanzen. Jede Versuchsgruppe bestand aus 5 Tieren. Außerdem erhielten gleich starke Kontrollgruppen die entsprechenden Mengen Wasser oder physiologische Kochsalzlösung. Nach Verabfolgung der zu untersuchenden Flüssigkeiten wurden die Harnmengen jedes einzelnen Tieres 6mal in Abständen von je

* Herrn Prof. Dr. O. Loewi in New York zum 80. Geburtstag gewidmet.

2 Std und nochmals 12 Std später gemessen. Neben der Ermittlung der Harnmenge wurde in regelmäßigen, im allgemeinen 4stündigen Abständen auch der Chloridgehalt des Harnes bestimmt (nach Volhard).

Ausführung der Versuche: Juni bis September 1952.

Ergebnisse.

Alle untersuchten mehrwertigen Alkohole bewirkten unverdünnt zugeführt eine deutliche Diurese, d. h. die unter ihrem Einfluß von den Versuchstieren abgesonderte Harnmenge war beträchtlich größer als die der Kontrolltiere. Die Diurese zeigte sich bereits bei der ersten Ablesung,

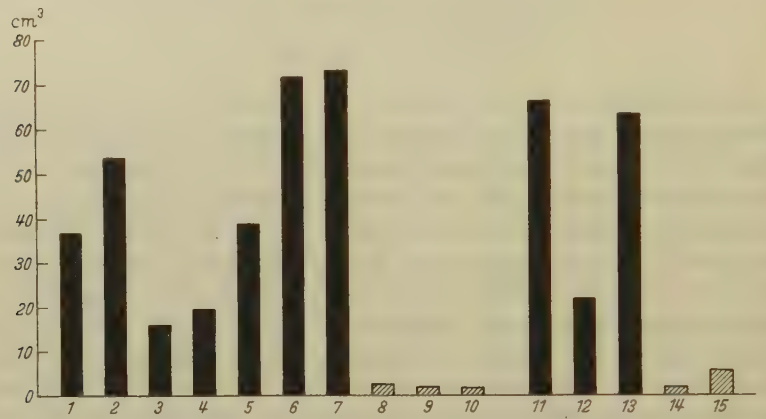


Abb. 1. Harnmengen von Ratten nach oraler Zufuhr von 1,0 cm³ 1,2-Propandiol (*1*), 1,3-Butandiol (*2*), Glycerin (*3, 4*), 1,2,4-Butantriol (*5*), Diäthylenglykol (*6, 7*) oder Aqua dest. (*8—10*) bzw. von 0,5 cm³ Äthandiol (*11*), 1,3-Butandiol (*12*), Diäthylenglykol (*13*) oder Aqua dest. (*14, 15*) je 100 g Körpergewicht. Jede Säule entspricht dem 12 Std-Wert von je 5 Tieren. Ordinate (Säulenhöhe): Harnmenge in Kubikzentimeter.

d. h. 2 Std nach Zufuhr der Prüfsubstanzen, und dauerte abgesehen von der Glycerin-Diurese mindestens 12 Std an. Aus Tab. 1 geht die während 12 Std von den 5 Tieren jeder Versuchsgruppe abgesonderte Harnmenge sowie der zeitliche Ablauf der Diurese hervor. Die Wirkung von 1,3-Butandiol und weniger deutlich auch von Diäthylenglykol — beide Substanzen wurden in kleinen (0,5 cm³ je 100 g Körpergewicht) und großen (1,0 cm³) Mengen verabreicht — erwies sich als dosisabhängig. Von den übrigen Alkoholen wurde die Wirksamkeit nur einer Dosis untersucht, einer hohen Dosis von 1,2-Propandiol, Glycerin, 1,2,4-Butantriol[3] und entsprechend der stärkeren Beeinflussung des Allgemeinzustandes[6, 8] einer niedrigen Dosis von Äthandiol. Ein Vergleich der unter dem Einfluß der verschiedenen mehrwertigen Alkohole abgesonderten Harnmengen ergibt im Sinne abnehmender Wirksamkeit folgende Reihe: Äthandiol, Diäthylenglykol, 1,3-Butandiol, 1,2,4-Butantriol, 1,2-Propandiol, Glycerin (Abb. 1).

Der besonders intensive diuretische Effekt von unverdünntem Äthandiol und Diäthylenglykol kam auch dann zum Ausdruck, wenn als Kriterium für den Wirkungsgrad die Zeit festgestellt wurde, die verging, bis die zugeführte Flüssigkeitsmenge ausgeschieden war. So wurde nach Verabfolgung dieser Glykole in 2 Std eine Harnmenge abgesondert, die einem mehrfachen der zugeführten Glykolmenge entsprach. Andererseits war nach Zufuhr von unverdünntem Glycerin die der verabfolgten Flüssigkeitsmenge entsprechende Harnmenge erst in 4 Std entleert.

Tabelle 1. *Harnmengen von je 5 Ratten nach oraler Zufuhr (Schlundsonde) mehrwertiger Alkohole (unverdünnt);*
Dosis: 0,5 bzw. 1,0 cm³ je 100 g Körpergewicht. Kontrolle: Aqua dest.

Prüfsubstanz	Dosis je 100 g Körpergewicht (cm³)	Gewicht 5 ♂ (g)	Harnmengen (cm³)			Harnmenge in	
			1.–4. Std	5.–8. Std	9.–12. Std	12 Std (cm³)	24 Std (cm³)
Äthandiol	0,5	792	33,9	20,8	11,2	65,9	72,3
1, 2-Propandiol	1	754	20,1	11,2	5,5	36,8	39,5
1, 3-Butandiol	1	752	23,6	18,3	11,5	53,4	58,6
1, 3-Butandiol	0,5	797	7,9	9,1	4,2	21,2	23,7
Glycerin	1	747	11,4	3,3	1,2	15,9	16,1
Glycerin	1	955	11,7	6,6	1,3	19,6	21,1
1, 2, 4-Butantriol	1	790	22,5	10,1	6,2	38,8	48,0
Diäthylenglykol	1	885				71,9	84,9
Diäthylenglykol	1	950	30,8	27,5	14,7	73,0	87,9
Diäthylenglykol	0,5	925	37,7	19,1	5,3	62,1	66,2
Aqua dest.	1	752	2,2	0,2	0,3	2,7	4,3
Aqua dest.	1	885				1,8	3,2
Aqua dest.	1	955	0,7	0,9	0,3	1,9	4,3
Aqua dest.	0,5	792	0,4	1,2	0,3	1,9	3,8
Aqua dest.	0,5	925	2,4	2,3	0,5	5,2	8,3

Weniger intensiv war die diuretische Wirkung, wenn die mehrwertigen Alkohole mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt als 10- bzw. 20vol%ige Lösung — 5,0 cm³ je 100 g Körpergewicht — zugeführt wurden. Zwar wurden von den Versuchstieren auch hier beträchtliche Harnmengen abgesondert, im allgemeinen waren sie sogar noch größer als bei Verwendung der unverdünnten Substanzen, aber im Vergleich zu den Harnmengen der Kontrolltiere war der Unterschied in der Menge weniger eindrucksvoll. Während bei den Kontrollgruppen innerhalb von 12 Std 8,5 bis 16 cm³ Harn gemessen wurden, lagen die entsprechenden Werte der Versuchstiere zwischen 26 und 75 cm³. Die diuretische Wirkung nicht aller Verbindungen dauerte bis zur 12. Stunde des Versuches an; so war der Effekt von Propandiol (20%ige Lösung) und Butandiol (10%ige Lösung) nach knapp 10 Std, der von Glycerin noch früher abgeklungen. Werden auch hier die mehrwertigen Alkohole

unter Berücksichtigung der Dosis nach ihrer Wirksamkeit geordnet, so ergibt sich, daß diese in der Reihenfolge Diäthylenglykol, Äthandiol, dann 1,2-Propandiol, 1,3-Butandiol, 1,2,4-Butantriol und schließlich Glycerin abnimmt (Abb. 2).

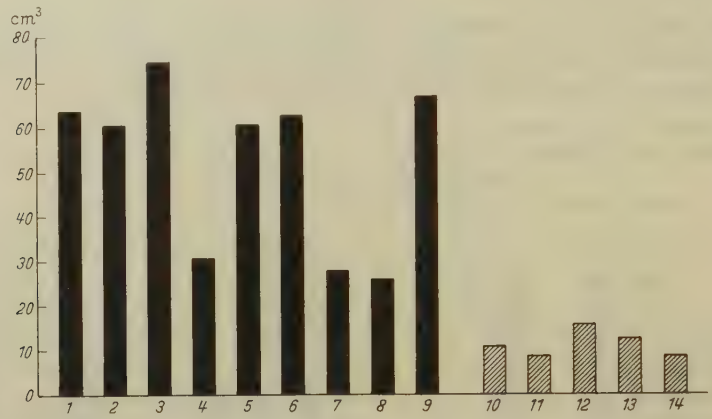


Abb. 2. Harnmengen von Ratten nach oraler Zufuhr von 5,0 cm³ einer 20%igen Lösung von 1,2-Propandiol (*1*), 1,3-Butandiol (*2*, *3*), Glycerin (*4*), 1,2,4-Butantriol (*5*) bzw. von 5,0 cm³ einer 10%igen Lösung von Äthandiol (*6*), 1,3-Butandiol (*7*, *8*), Diäthylenglykol (*9*) je 100 g Körpergewicht (Verdünnungsmittel: physiologische Kochsalzlösung). Die Säulen 10—14 geben die Harnmengen der Vergleichsgruppen wieder, denen je 100 g Körpergewicht 5,0 cm³ physiologische Kochsalzlösung verabfolgt war. Jede Säule entspricht dem 12 Std-Wert von je 5 Tieren. Ordinate (Säulenhöhe): Harnmenge in Kubikzentimeter.

Tabelle 2. *Harnmengen von je 5 Ratten nach oraler Zufuhr (Schlundsonde) 10 bzw. 20%iger Lösungen von mehrwertigen Alkoholen (Verdünnungsmittel: physiologische Kochsalzlösung);*
Dosis: 5 cm³ je 100 g Körpergewicht. Kontrolle: physiologische Kochsalzlösung.

Prüfsubstanz	Dosis je 100 g Körpergewicht (cm³)	Gewicht 5 ♂ (g)	Harnmengen (cm³)			Harnmenge in	
			1.—4. Std	5.—8. Std	9.—12. Std	12 Std (cm³)	24 Std (cm³)
Äthandiol	0,5	635	34,6	21,2	7,0	62,8	68,2
1, 2-Propandiol	1	635	51,7	9,9	2,1	63,7	64,4
1, 3-Butandiol	1	700	38,2	17,8	4,7	60,7	62,7
1, 3-Butandiol	1	757	43,8	22,2	8,6	74,6	78,9
1, 3-Butandiol	0,5	700	17,4	7,2	2,5	27,1	29,7
1, 3-Butandiol	0,5	750	14,4	8,1	3,2	25,7	29,0
Glycerin	1	732	29,5	0,9	0,3	30,7	32,5
1, 2, 4-Butantriol	1	735	32,5	17,1	10,7	60,3	72,8
Diäthylenglykol	0,5	910	44,5	16,4	5,3	66,2	69,5
physiol. Kochsalzlösung .		710	9,2	3,6	3,0	15,8	23,9
physiol. Kochsalzlösung .		635	5,6	1,5	3,0	10,1	14,7
physiol. Kochsalzlösung .		755	4,2	1,9	2,3	8,4	14,6
physiol. Kochsalzlösung .		734	7,5	0,9	3,9	12,3	20,5
physiol. Kochsalzlösung .		910	5,2	2,2	1,1	8,5	14,9

In einem letzten Versuchsgang wurde geprüft, ob die mehrwertigen Alkohole auch dann eine Diurese hervorrufen, wenn sie verdünnt mit destilliertem Wasser angewandt werden. Ähnlich wie bei der Untersuchung der mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Alkohole war auch hier die Harnmenge der Versuchstiere größer als die der Kontrolltiere, nur war der Unterschied noch geringer (Tab. 3). Die in der 9.—10. Stunde nach Zufuhr von wäßriger Glycerinlösung ermittelten Harnmengen lagen im Bereich der Harnmengen, welche bei Kontrolltieren ebenfalls

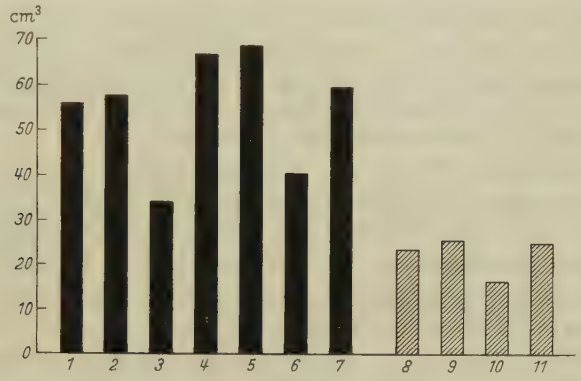


Abb. 3. Harnmengen von Ratten nach oraler Zufuhr von 5,0 cm³ einer 20%igen Lösung von 1,2-Propandiol (*1*), 1,3-Butandiol (*2*), Glycerin (*3*), 1,2,4-Butantriol (*4*) bzw. von 5,0 cm³ einer 10%igen Lösung von Äthandiol (*5*), 1,3-Butandiol (*6*), Diäthylenglykol (*7*) je 100 g Körpergewicht (Verdünnungsmittel: Aqua dest.). Die Säulen 8—11 geben die Harnmengen der Vergleichsgruppen wieder, denen je 100 g Körpergewicht 5,0 cm³ Aqua dest. verabfolgt war. Jede Säule entspricht dem 12 Std-Wert von je 5 Tieren. Ordinate (Säulenhöhe): Harnmenge in Kubikzentimeter.

beobachtet wurden. In der 11.—12. Stunde entsprachen auch bei den mit Propandiol (20%ige Lösung) oder Butandiol (10%ige Lösung) behandelten Ratten die Harnmengen etwa denen der Kontrolltiere, während bei den übrigen Versuchsgruppen zu diesem Zeitpunkt eine vermehrte Diurese noch erkennbar war. In dieser Anordnung wirken Äthandiol und Diäthylenglykol am stärksten, 1, 2, 4-Butantriol, 1, 3-Butandiol und 1, 2-Propandiol schwächer, Glycerin nur wenig (Abb. 3).

Tabelle 3. *Harnmengen von je 5 Ratten nach oraler Zufuhr (Schlundsonde) 10 bzw. 20%iger Lösungen von mehrwertigen Alkoholen (Verdünnungsmittel: Aqua dest.); Dosis: 5 cm³ je 100 g Körpergewicht. Kontrolle: Aqua dest.*

Prüfsubstanz	Dosis je 100 g Körpergewicht (cm³)	Gewicht 5 ♂ (g)	Harnmengen (cm³)			Harnmenge in	
			1.—4. Std	5.—8. Std	9.—12. Std	12 Std (cm³)	24 Std (cm³)
Äthandiol	0,5	665	41,3	20,1	7,2	68,6	74,7
1, 2-Propandiol	1	665	42,7	11,3	2,0	56,0	57,0
1, 3-Butandiol	1	702	32,3	18,2	6,8	57,3	61,2
1, 3-Butandiol	0,5	697	32,2	6,3	1,6	40,1	43,4
Glycerin	1	701	30,4	3,4	0,2	34,0	36,5
1, 2, 4-Butantriol	1	665	39,2	16,3	11,2	66,7	76,6
Diäthylenglykol	0,5	915	32,2	20,2	7,2	59,6	64,2
Aqua dest.		702	22,2	1,1	1,8	25,1	28,7
Aqua dest.		665	19,5	1,6	2,0	23,1	27,4
Aqua dest.		730	20,5	2,7	1,8	25,0	29,0
Aqua dest.		920	13,9	1,3	0,9	16,1	18,4

Trotz Beachtung der von Burn[5] aufgestellten Forderung, nur gleich schwere männliche Tiere, welche unter konstanten Bedingungen gehalten waren, zu verwenden, streuen die vergleichbaren Meßwerte recht stark. Das grundsätzliche Ergebnis, d. h. die diuretische Wirkung von unverdünnten wie verdünnten Glykolen im Vergleich zu entsprechender Flüssigkeitszufuhr (Wasser bzw. physiologische Kochsalzlösung) in Kontrollversuchen, war aber auch bei mathematischer Behandlung* der 12 Std-Harnmengen in jedem Fall signifikant.

Die Bestimmungen der Chloride ergaben im Harn der Versuchstiere durchschnittlich einen höheren Gehalt als in dem der Kontrolltiere[14], während die Mittelwerte der Chlorid-Konzentrationen keine Unterschiede zeigten.

Zur Klärung der Frage, wie die beschriebene, durch mehrwertige Alkohole ausgelöste Harnflut zustandekommt, könnten Versuche beitragen, in denen geprüft wurde, ob die 1,3-Butandiol-Diurese durch gleichzeitige Verabreichung von kleinen Mengen Hypophysenhinterlappenextrakt hemmbar ist[10]. Tatsächlich wurde durch eine derartige Behandlung die Diurese — Stundenwerte: 2,8, 3,9, 4,5, 6,4 cm³ statt 4,8, 8,3, 10,1, 10,5 cm³ — deutlich eingeschränkt[11], ähnlich wie es Strauss, Rosenbaum u. Nelson[12] bei Untersuchung der harntreibenden Wirkung von Äthylalkohol gefunden haben. So lag es nahe, für den untersuchten mehrwertigen Alkohol 1,3-Butandiol ebenso wie für den einwertigen Alkohol Äthanol eine Hemmung der Rückresorption als Grund ihres diuretischen Effektes anzunehmen. Mit dieser Vorstellung ist die Tatsache, daß zahlreiche mehrwertige Alkohole mit dem Harn ausgeschieden werden, gut vereinbar.

Im übrigen konnten die meisten der genannten Glykole auch in der Gallenflüssigkeit[4,11] nachgewiesen werden, dabei war die Gallemenge nicht vermehrt[1,2]; doch der Mechanismus von Galle- und Harnsekretion unterliegt bekanntlich verschiedenen Gesetzen.

Zusammenfassung.

Äthandiol und Diäthylenglykol besitzen eine sehr kräftige, 1,3-Butandiol, 1,2-Propandiol und 1,2,4-Butantriol eine deutliche diuretische Wirkung, während Glycerin eine nur mäßige Vermehrung der Harnmenge veranlaßt.

Der diuretische Effekt der mehrwertigen Alkohole bleibt auch bei Verwendung 10- bzw. 20%iger Lösungen dieser Substanzen (Verdünnungsmittel: destilliertes Wasser oder physiologische Kochsalzlösung) erkennbar.

---

* Der Berechnung wurde der Ausdruck

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n-1}},\quad \varepsilon = \frac{\sigma}{\sqrt{n}},\quad \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2}} = R$$

zugrunde gelegt; $R > 2$ gilt als signifikant (vgl. Burn).

Literatur.

[1] Bornmann, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 209 (1952). — [2] Bornmann, G.: Arzneimittel-Forsch., Aulendorf **2**, 122 (1952). — [3] Bornmann, G., A. Loeser u. G. Meyer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 361 (1950). — [4] Bornmann, G., u. K. Ritter: Unveröffentlichte Versuche. — [5] Burn, J. H.: Biologische Auswertungsmethoden. Berlin: Springer 1937. — [6] Fischer, L., R. Kopf, A. Loeser u. G. Meyer: Z. exper. Med. **115**, 22 (1949). — [7] Ginsberg, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **69**, 381 (1912). — [8] Kopf, R., A. Loeser, G. Meyer u. W. Franke: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 346 (1950). — [9] Laug, E. P., H. O. Calvery, H. J. Morris and G. Woodard: J. Ind. Hyg. Toxicol. **21**, 173 (1939). — [10] Muylder, E.: zit. nach E. Frey, Nierentätigkeit und Wasserhaushalt, S. 36. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1951. — [11] Ritter, K.: Inaug. Diss., Med. Fak. Univ. Münster 1953. — [12] Strauss, M. B., J. D. Rosenbaum and W. P. Nelson: J. Clin. Invest. **29**, 1053 (1950). — [13] Ustimowitsch, C.: Pflügers Arch. **13**, 453 (1876). — [14] Vollmer, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **186**, 565, 576, 584, 592 (1937). — [15] van Winkle jr., W.: J. of Pharmacol. **72**, 344 (1941).

Dr. Gerhard Bornmann, Münster/Westf., Pharmakol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 64—75 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Schulemann).

Digitalisstoffe und Impulsaussendung des Herzens*.

Von
H. F. Zipf und H. Miestereck.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. Januar 1953.)

Die chemische Verwandtschaft der Digitaliskörper mit der Veratringruppe und gemeinsame pharmakologische Wirkungszüge ließen daran denken, daß Digitalisstoffe an den sensiblen Endapparaten der Herzvagusäste eine veratrinähnliche Wirkung zeigen. Hier steigert Veratrin die Erregbarkeit der Receptoren derart, daß die Aktionsimpulse nicht mehr synchron mit dem Herzschlag, sondern kontinuierlich auftreten. Bei den herzwirksamen Glykosiden konnte synchron mit dem Herzschlag, neben einer solchen kontinuierlichen Aussendung von Aktionsströmen, auf Grund der positiv inotropen Wirkung eine gesteigerte Erregung der propriozeptiv tätigen Dehnungsreceptoren in der Herzmuskulatur, und damit eine Verstärkung der herzsynchronen Signalübermittlung zu den Zentren erwartet werden. Diese Erwartungen auf ihre Wirklichkeit zu prüfen, war das Ziel der hier mitgeteilten Untersuchungen. Es kamen dabei Gaben in Frage, die möglichst noch an der Grenze der klinischen Dosimetrie lagen. Neben einmaligen intravenösen Dosen kam auch die fortlaufende Zufuhr von Digitaliskörpern (im Sinne eines Digitalistestes) zur Anwendung. Untersucht wurden k-Strophantin β (Kombetin), Digitoxin „Merck" und Convallatoxin.

Bezüglich der *Versuchsanordnung* sind die notwendigen Angaben bei Zipf und Miestereck zu finden. Im Laufe der Untersuchungen konnte die photographische Registrierung wesentlich verbessert werden. Durch Verwendung der Voigtländer-Optik „Nokton" 1:1,5 und einer Kathodenstrahlröhre mit blau fluorescierendem Schirm ließen sich die Aktionsströme direkt auf (perforierten) Papierfilm aufnehmen, so daß ein wesentlicher Teil an Kopierarbeit und Zeit gespart wurde.

Versuchsergebnisse.

I. Wirkung einmaliger Gaben verschiedener digitalisartiger Stoffe.

Wir behandelten mit einmaligen intravenösen Injektionen insgesamt 16 Katzen. Davon erhielten 4 Tiere je 2,5 γ/kg, 4 weitere 5 γ/kg und 2 Tiere 10 γ/kg *Kombetin*. Wir sahen 3mal einen steigernden Einfluß auf die Frequenz und Amplituden der Herznervenimpulse und 2mal

* Herrn Prof. Dr. Otto Loewi zum 80. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

einen fraglichen Erfolg. Bei 6 Tieren verabreichten wir 5mal je 2,5 γ/kg und 1mal 5 γ/kg *Convallatoxin* intravenös. 2 Tiere sprachen mit einer deutlichen Impulssteigerung (Frequenz und Intensität) an, bei einem war der Erfolg nicht sicher zu erkennen. *Digitoxin* wurde mit einer Dosis von 5 γ/kg intravenös nur einem Tier gegeben, jedoch ohne sichtbaren Erfolg. Dauerentladungen, wie bei Veratrin wurden bei diesen einmaligen Dosen nie beobachtet. Bei den nicht immer vorhandenen Einwirkungen auf die Herzrezeptoren handelt es sich also um fördernde Impulsbeeinflussungen im Zusammenhang mit der Herzevolution. Die Zahl der ansprechenden Tiere ist bei dem angewandten Dosenbereich, der etwa in der Größenordnung der therapeutischen Dosimetrie lag, verhältnismäßig gering. Darüber braucht man sich nicht zu wundern, wenn man an den bekannten Wirkungsunterschied der Digitalisstoffe am gesunden und dekompensierten Herzen denkt, ganz abgesehen von der Gegenüberstellung Tier und Mensch. Die für den Nachweis der Herznervenaktionsströme notwendige operative Technik machen es wahrscheinlich, daß ein Teil der im Versuch befindlichen Katzenherzen so in seinem Stoffwechsel geschädigt wurde, daß die „therapeutische" Digitaliswirkung zum Vorschein kam. Auf die gleichzeitige Messung des Kammer- oder Vorhofinnendruckes mußten wir mit Rücksicht auf die exakte Registrierung der Aktionsströme verzichten.

Im folgenden soll einer der positiv reagierenden Fälle abgebildet und beschrieben werden.

In der Abb. 1a—e ist die Wirkung von 2,5 γ/kg *Convallatoxin* intravenös auf die afferenten Impulse in einem dünneren Aste des rechten Herzvagusfächers wiedergegeben. Wertet man diesen Versuch genauer aus, dann kommt man zu folgenden Feststellungen: Es gibt vorhofssynchrone Aktionsströme (VAS), die hohe Potentiale aufweisen, dicht und kurzdauernd sind. Sie beginnen etwa auf der Mitte der negativen P-Zacke und enden bei R oder kurz danach. Die Amplituden steigen, dem mechanischen Kontraktionsvorgang entsprechend, etwas schneller an als ab. Durch eine deutliche Pause davon getrennt, liegen die *kammersynchronen* Aktionsströme (KAS), länger andauernd, lichter stehend und von niedrigeren Amplituden. Sie reichen bis auf die Höhe oder das Ende von T. Die den Inspirationen entsprechenden Lungendehnungen drücken der Impulsfolge eine periodisch wiederkehrende Charakteristik auf, die darin besteht, daß zu den bisherigen Vorhofs- und Kammeraktionsströmen gleich hohe und auch höhere Impulse hinzukommen. Diese erscheinen besonders in der zweiten Hälfte der KAS-Gruppen, also sehr wahrscheinlich auf oder kurz hinter dem Gipfel der Kammerdruckkurve. Diese zusätzlichen von der Lungendehnung abhängigen Aktionsimpulse beweisen, daß neue A-Receptoren ansprechen. Zählt man die Kammerimpulse an den Originalfilmen aus, dann kommt man zu der Darstellung

der Abb. 2a—e. Solche Auszählungen sind bei dichterer Impulsfolge und durch Superposition (Knotenbildung) erschwert. Wir haben einen Knoten in auf- oder absteigenden Teilen der Aktionsstromzacke immer als wirklich abgelaufenen Impuls gerechnet. Die Auszählung in Abb. 2a bis e zeigt ganz deutlich für die KAS eine Abhängigkeit von der In-

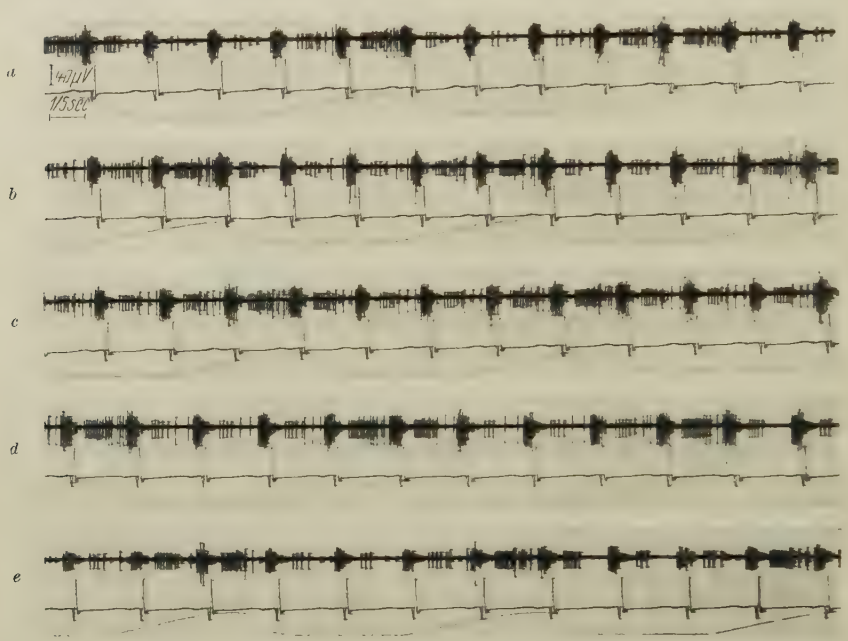


Abb. 1 *a—e*. Wirkung von 2,5 γ/kg Convallatoxin intravenös auf die afferenten Impulse in einem hohen, dünnen rechten Herzvagusast aus der Gruppe *1* (obere Kurve). Elektrokardiogramm (mittlere Kurve). Lungendehnungskurve (untere Kurve). Eichspannung von 40 µV gilt für die Aktionsimpulse. Zeit: 1/5 sec. Katze, ♀, 2,3 kg. Narkose: 75 mg/kg Chloralose (5% in 25% Urethan) per os. *a* normal; *b* sofort nach 2,5 γ/kg Convallatoxin intravenös; *c* 1 min; *d* 4 min; *e* 8 min nach der Injektion.

spiration. Die Darstellung wäre noch gleichmäßiger, wenn EKG und künstliche Beatmung in einem harmonischen Verhältnis ablaufen würden.

Bei der Deutung dieser Periodik kann man sich verschiedene Möglichkeiten vorstellen, z. B. daß nach Wagner (1940) bei der Inspiration der Druck in der Art. pulmonalis zunimmt, dadurch die erhöhte Druckentwicklung in der Kammer die Folge ist, und sowohl bisher erregte A-Receptoren stärker, als auch früher inaktive zusätzlich erregt werden. Es kann sich dabei sowohl um die wenigen, in den Kammern vorhandenen, als auch um die im Vorhof befindlichen A-Receptoren handeln. Letztere werden dann indirekt durch Verschiebung der Klappenebene erregt. Die Möglichkeit besteht auch, daß es Receptoren in den Pulmonalarterien sind, die zusätzlich ansprechen, oder daß es nicht nur die Widerstandserhöhung im Pulmonalarteriengebiet, sondern auch die Zerrung der künstlich beatmeten Lunge an den Vorhöfen und herznahen Venen ist, die deren Receptoren dehnungsempfindlicher macht.

Sofort nach der intravenösen Gabe von *2,5 γ/kg Convallatoxin* beginnt die Zunahme der Frequenz, sowohl der kammer- als auch der vorhofssynchronen Impulse. In der Abb. 1 b muß man hierbei entsprechende Abschnitte vergleichen, also die Impulsserien während der Inspirationen, *oder* während der Beatmungspausen. Das Auszählergebnis ist in Abb. 2 b festgehalten. Während der Inspiration und Atempause tendieren die KAS zu einer Frequenzzunahme. 1 min später (Abb. 1 c und 2 c) ist die Impulsfrequenz am deutlichsten gesteigert. Nach 4 min erkennt man den Effekt für die „Pausen-KAS" gerade noch (Abb. 1 d und 2 d). Die

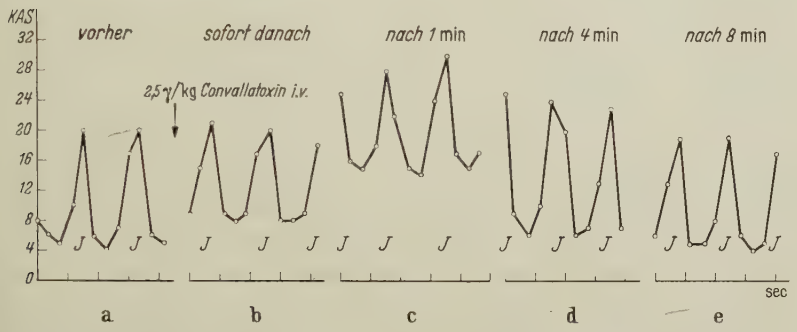


Abb. 2 *a—e*. Gleicher Versuch wie in Abb. 1 *a—e*. Graphische Darstellung der ausgezählten kammersynchronen Impulse. *a, b, c, d, e*: siehe Abb. 1 *a—e*. *KAS* Kammeraktionsströme je Herzschlag; *J* Inspiration.

„Inspirations-KAS" befinden sich noch auf der Höhe der Wirkungssteigerung. 8 min nach der Injektion sind alle Effekte verschwunden (Abb. 1 e und 2 e). Was in der Abb. 2 nicht, sondern nur in den Originalkurven zum Ausdruck kommt, sind die *höheren Amplituden der neu hinzugetretenen Aktionsströme*, weiterhin die Verringerung der Zwischenräume zwischen dem Ende der Kammergruppen und dem Anfang der Vorhofsgruppen. Auffallend sind vor allem wieder die zusätzlichen und höheren Impulse in der zweiten Hälfte der KAS-Gruppe. Sie deuten, wie schon oben erwähnt, auf gesteigerte Kammerkontraktionen hin, diesmal aber durch Convallatoxin bedingt. Es müssen ganz neue A-Receptoren in Aktion getreten sein. Umgekehrt kann man sagen: Die Aktivierung vorher schon tätiger, oder die zusätzliche Erregung bisher ruhender Receptoren kann als *Indicator der Kontraktionsverstärkung* gelten, da die A-Receptoren mit eingebauten Manometern verglichen werden können. Damit ist auch die erste Deutungsmöglichkeit der Impulssteigerung erwähnt: die *erhöhte Kontraktionskraft und -geschwindigkeit* des Herzmuskels. Als weitere Möglichkeit muß eine durch Convallatoxin gesteigerte Erregbarkeit, also eine *Sensibilisierung* der Herz-Receptoren gegenüber den mechanischen Reizen in Betracht gezogen

werden, analog zu Wirkung von Veratrin. Auch eine Kombination beider kommt in Betracht. Zusammenfassend können wir sagen, daß in *einem Teil der Versuche durch Kombetin und Convallatoxin eine vorübergehende Steigerung der herzsynchronen Impulsaussendung* beobachtet wurde.

II. Änderungen der Impulsaussendung während der intravenösen Dauerinfusion.

Intravenöse Dauerinfusionen wurden an Katzen durchgeführt und zwar an 2 Tieren mit *Convallatoxin* bei einer Infusionsrate von 12,4 γ und 3,84 γ/kg/min, an 4 Tieren mit 3,44 γ, 3,84 γ, 6,25 γ und 6,45 γ/kg/min *Kombetin*, an einem Tier mit 10 γ/kg/min *Digitoxin*. Die erhaltenen Bilder waren verschiedenartig und schienen uns ganz von der Art und Menge der vor Infusionsbeginn tätigen Receptoren abzuhängen. Allen Versuchen war zunächst gemeinsam die Beziehung der jeweiligen Impulsperiodik und -stärke zu dem jeweils erreichten Grad der Rhythmusstörung und Kontraktionsschädigung. Dabei konnten schwer erklärbare Bilder erhalten werden, die sich wohl erst nach Vorliegen weiterer Erfahrungen in einem einheitlichen Sinne ausdeuten lassen. Die völlige Dissoziation von Vorhofs- und Kammertätigkeit, der sogenannte AV-Block machte sich in typischer Weise bemerkbar, indem bei wechselnder zeitlicher Versetzung beider die zugehörige synchrone Impulstätigkeit ebenfalls den Ort wechselte. Lediglich für den Fall, daß Vorhof und Kammer gleichzeitig und damit gegeneinander schlugen, entstanden durch Interferrenz veränderte Impulsbilder. Die zunehmende toxische Herzmuskelschädigung und der drohende Herzstillstand schwächten gegen Ende der Dauerinfusion die Impulshöhen immer stärker ab. Nach eingetretenem Herzstillstand waren alle durch die Systole bedingten hohen Dehnungsimpulse verschwunden, aber über dem Störpegel blieb noch längere Zeit eine asphyktische Dauerimpulstätigkeit erkennbar. Eine *vorübergehende Steigerung der kammersynchronen Impulse* infolge Kontraktionsverstärkung, wie sie im vorigen Abschnitt beschrieben wurde, konnten wir in beiden Convallatoxinversuchen *in den ersten Minuten der Dauerinfusion* beobachten. In den 4 Versuchen mit Kombetin ließ sie sich einmal deutlich nachweisen.

Eine *Dauerentladung im Sinne der Veratrinwirkung* entwickelte sich in einem von den 2 Convallatoxin- und in 2 von den 4 Kombetinversuchen. Eines der Beispiele wird unten an Hand der Abb. 3a—k genauer beschrieben. In den beiden anderen Fällen bestanden von vornherein Dauerentladungen, mit großer Wahrscheinlichkeit von „Chemoreceptoren“ (oder Schmerzreceptoren) herrührend, die durch die Stoffwechselprodukte des geschädigten Herzmuskels in Dauererregung gerieten. Jedenfalls war in solchen Fällen eine digitalisbedingte Dauer-

entladung nicht mit solcher Deutlichkeit herauszulesen, wie etwa in den Fällen, bei denen von Anfang nur Dehnungsreceptoren tätig waren und die Herzschädigungen erst durch den Digitalisstoff gesetzt wurden.

Wir bringen nun ein Beispiel (Abb. 3a—k) für das Entstehen einer *veratrinartigen Dauerentladung durch Kombetin*. Betrachten wir die Impulse (Abb. 3a), so zeigte der abgeleitete Nerv anfangs nur wenig hohe Aktionsströme, einmal vorhofsynchrone (etwa 3—5), in der Inspirationsphase auch einige wenige atemsynchrone (4). Letztere stammten mit großer Wahrscheinlichkeit nicht von beigemischten Lungenvagusfasern her, sondern sie entstanden durch jeweilige Zerrung der Lungenwurzel an den herznahen Venen und Vorhöfen im Takte der künstlichen Beatmung. Kammersynchrone Impulse waren nicht zu bemerken. Das Bild änderte sich etwa 8 min nach Beginn der Dauerinfusion. Die „atemsynchronen" Impulse begannen jetzt an Zahl zuzunehmen (Abb. 3b). Kammersynchrone Impulse fehlten immer noch. Von der 17. min an (Abb. 3c) trat die „atemsynchrone" Impulszunahme noch deutlicher hervor, gleichzeitig erschienen die ersten, noch nicht sehr hohen kammersynchronen Impulse, auch in den Atempausen erkennbar. Die Hauptveränderung vollzog sich in der 20. min, etwa parallel mit der nun deutlich hervorgetretenen Änderung des EKG (Abb. 3d). Die Zunahme der Kammerimpulse und der „atemsynchronen" Entladungen war nun beträchtlich, verglichen mit dem anfänglichen Aktionsstrombild. Wäre man zu Beginn des Versuches der Auffassung gewesen, es hätten in den abgeleiteten dünnen Nerven nur wenige intakte Fasern vorgelegen, so könnte man jetzt glauben, es handle sich um einen verhältnismäßig dicken Nerven mit relativ vielen tätigen Fasern. Es muß also angenommen werden, daß bisher inaktive Receptoren entweder durch stärker angreifende mechanische Reize (veränderte Spannung des Hermuskels) oder infolge Sensibilisierung in Aktion gerieten. Wir halten die letztere Erklärungsmöglichkeit für die wahrscheinlichere.

Man muß nach einer solchen Verwandlung einer gering tätigen Faser zu einem bewegten Aktionsbild zur Vorsicht mahnen. Einige wenige Impulse beweisen noch nicht, daß in dem betreffenden Nerven nur wenige Receptoren erfaßt werden. Ein Teil der sensiblen Endorgane kann zunächst inaktiv sein, später jedoch durch verschlechterte Stoffwechselverhältnisse oder durch Pharmaka zur Impulsaussendung erregt werden.

Nach 22½ min war ein AV-Block zustande gekommen. Es ergab sich zu gleicher Zeit eine weitere Änderung im Aktionsstrombild (Abb. 3e). Die Impulse waren nicht mehr durch Lücken abgegrenzt, die eine Beziehung zur Herzevolution zeigten, sondern eine kontinuierliche Folge von Aktionsimpulsen mit hohen Amplituden beherrschte das Bild. In ihr ließen sich allerdings die vorhofssynchronen Impulse noch deutlich erkennen. Der Vorhof schlug noch regelmäßig, aber in laufender zeitlicher Versetzung zum AV-Kammerrhythmus. Die „atemsynchrone"

Periodik trat innerhalb der Dauerentladung zurück und machte auf diese Weise nachträglich ihre Entstehung an den Vorhof- und Venenreceptoren wahrscheinlich. Die sehr hohen Dauerimpulse wiesen fast gleiche Höhen und Abstände auf und erinnerten somit an die bekannten Veratrindauerimpulse. Es war also durch Kombetin wahrscheinlich zu einer Sensibilisierung der Herzreceptoren, besonders der mit unserer Präparationstechnik vorwiegend erfaßten Dehnungsreceptoren des Vorhofes gekommen, wie wir es in ähnlicher Weise vom Veratrin kennen. Dissoziiert voneinander schlagende Vorhöfe und Kammern unterhielten an den sensibilisierten Dehnungsreceptoren eine dauernde Zerrung. Die noch sichtbare Impulsperiodik war die jeweilige Antwort auf die herrschenden Druckabläufe an den in Frage kommenden Receptoren. In der Abb. 3f (nach 26 min) war neben der kammersynchronen teilweise auch noch die vorhofssynchrone Periodik zu erkennen. Im ganzen erregten die veränderten, schlechteren Druckabläufe nicht mehr zu Dauerentladungen. Die atemsynchronen Serien kamen wieder zum Vorschein. Dies gilt auch für die Verhältnisse in Abb. 3g (nach 29½ min). Zu diesem Zeitpunkt wurde die Dauerinfusion beendet. Die eingelaufene Gesamtmenge betrug 190 γ/kg Kombetin intravenös. Sie genügte, um anschließend einen Herzstillstand herbeizuführen. Die Impulshöhen nahmen 3 min nach Infusionsende ab (Abb. 3h), die „atemsynchronen" Serien traten wieder stärker hervor. Der drohende Kammerstillstand kündigte sich nach 4½ min an (Abb. 3i) und 5½ min nach Beendigung der Dauerinfusion stand die Kammer still (Abb. 3k). Eine asphyktisch bedingte Dauerentladung zeigte an, daß die Receptoren noch eine Zeitlang überlebten (siehe Schaefer), und im Sinne von „atemsynchronen" Impulsen erregt werden konnten. Deren Höhe war sehr gering. Wären sie wirklich von Lungendehnungsreceptoren aus über vorhandene Lungenvagusfasern geleitet worden, dann müßte allen unseren Erfahrungen nach die echte atemsynchrone Periodik noch eine gute Zeit nach dem Herztod in alter Höhe erkennbar bleiben.

Wir können als Ergebnis der Versuche mit Dauerinfusion also feststellen, daß sich tatsächlich *mit verschiedenen Stoffen der Digitalisgruppe in einem Teil der Versuche eine veratrinartige Dauerentladung einstellen ließ.*

Besprechung.

Bei der Deutung der therapeutischen und toxischen Digitalisbradykardie hat man neben einer Sensibilisierung des Vagus an eine reflektorische Genese von chemisch-sensibilisierten Herzreceptoren her gedacht. Von Zipf u. Ehrlicher wurde an Kaninchen und Katzen durch Nervenausschaltungen bewiesen, daß für toxische Gaben von „Digitaliskörpern" eine Entstehung über den kardiokardialen Zweig des Bezold-Jarisch-Reflexes (BJR) nicht in Frage kommt, wohl aber von Carotissinus- und

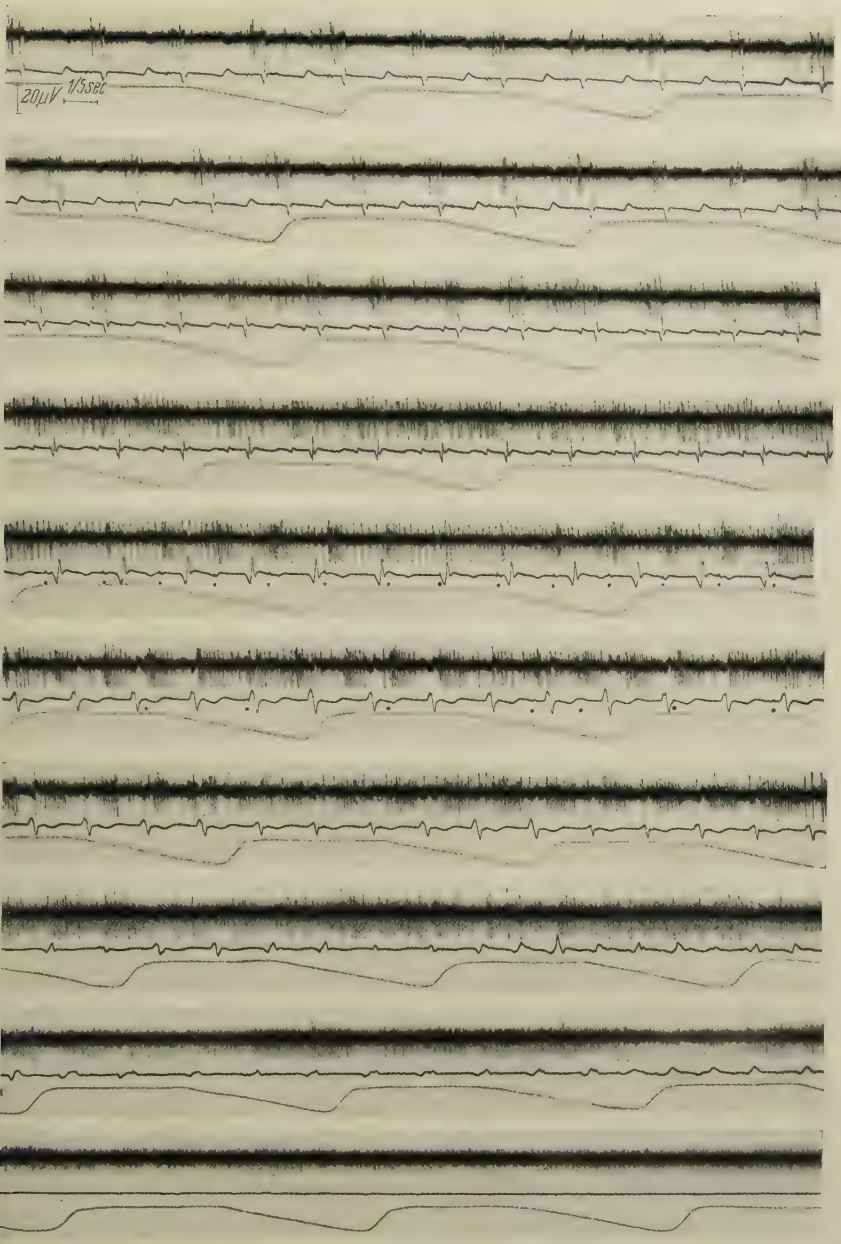


Abb. 3 *a*—*k*. Wirkung einer intravenösen Dauerinfusion von k-Strophantin *β* auf die afferenten Impulse in einem hohen dünnen rechten Herzvagusast (obere Kurve). EKG (mittlere Kurve). Lungendehnungskurve (untere Kurve). Katze, ♂, 1,55 kg. Narkose: 75 mg/kg Chloralose (5% in 25% Urethan) per os. *a* normal, *b* 8 min nach Beginn einer i. v. Dauerinfusion von 6,45 *γ*/kg/min k-Strophantin *β*, *c* 17 min, *d* 20 min, *e* 22½ min, *f* 26 min, *g* 29½ min nach Infusionsbeginn (Eingelaufene Gesamtdosis = 190 *γ*/kg i. v.), Infusion beendet, *h* 3 min, *i* 4½ min, *k* 5½ min nach Infusionsende. Die sicher erkennbaren Vorhofskontraktionen sind durch Punkte gekennzeichnet.

Aortenbogenreceptoren her. Damit konnte man die Digitalisstoffe zwar nicht in die Gruppe der „Detektorstoffe" des Bezold-Jarisch-Reflexes (BJR) aufnehmen, wohl aber als Reizstoffe anderer sensibler Endapparate bezeichnen. Von den chemisch ähnlich aufgebauten Veratrinalkaloiden weiß man, daß nicht nur eine Erregung an den BJR-Receptoren in Frage kommt, sondern, daß diese Stoffe viele andersartige, sensible Endorgane reizen und zur verstärkten und vermehrten Impulsaussendung anregen, z. B. die sensiblen Lungendehnungs-, Darmdehnungs-Muskelreceptoren und schließlich die Dehnungsreceptoren des Herzens. Wie können wir nun unsere Befunde hier einordnen?

Es sind offenbar *2 Arten der fördernden Impulsbeeinflussung* möglich: Eine Steigerung der zur Vorhofs-, vor allem aber zur Kammertätigkeit zugehörigen Impulstätigkeit ergibt sich aus der Grundwirkung der Digitaliskörper, ihrer Verkürzung der Anspannungszeit und Verstärkung der Kontraktionskraft. Sie ist abhängig von den jeweiligen Versuchsbedingungen und kann nur in Erscheinung treten, wenn das betroffene Herz eine „therapeutische" Beeinflussung zuläßt. Aus diesem Grunde war nur bei *einem Teil der Versuche mit therapeutisch vergleichbaren Dosen eine kontraktionsbedingte Zunahme der Impulsamplitude und -frequenz zu erwarten* und auch eingetreten. Aber nicht nur bei klinisch vergleichbaren Einzeldosen, sondern auch in der Anfangsphase der toxisch wirkenden Dauerinfusion trat die fördernde Impulsbeeinflussung in Erscheinung.

Die zugrunde liegende Muskelwirkung der Glykoside, die Steigerung der systolischen Herzkraft und Verkürzung der Anspannungszeit braucht dabei noch nicht am EKG erkennbar zu sein. Es ist bekannt, daß sie tierexperimentell (Hunde) schon bei Dosen eintritt, die noch keine EKG-Änderungen bewirken (Walton, Leary und Jones). Wir haben die Beziehung mit der Kammerdruckkurve nicht herstellen können, da hierzu die methodischen Voraussetzungen noch nicht vorlagen. Wir stellen lediglich folgende Zusammenhänge fest: In einem Teil unserer Herzen konnten wir eine Steigerung von Frequenz und Intensität der afferenten Herzvagusimpulse feststellen, beim anderen nicht. Wir wissen schließlich, daß in Tierversuchen, besonders bei pharmakologisch oder durch Operation geschädigten Herzen „therapeutische" Digitaliswirkungen hervortreten können. Schließlich ist die Digitaliswirkung in der Form gesichert, daß am Herzen des Gesunden nach Strophantin nichts zu sehen war, beim Herzkranken durch k-Strophantin und Digitalis eine deutliche Verkürzung der Anspannungszeit und eine in ihrer Größe wechselnde Verlängerung der Austreibungszeit zu beobachten war (Blumberger, Sarre und Meilinger).

Es sind also diejenigen Faktoren gegeben, die ändernd auf den Quotienten $\Delta P/\Delta t$ einwirken, denn auf die systolische Druckänderung pro Zeiteinheit kommt es an (Wagner, 1950), wenn die Dehnungsreceptoren des Herzens erregt werden sollen. Der beschleunigte intraventrikuläre Druckablauf in der ersten Kontraktionsphase wird hierbei eine Rolle spielen und (weniger direkt über Kammerreceptoren als durch

eine Verschiebung der Klappenebene) indirekt über die zahlreichen Dehnungsreceptoren der Vorhöfe (SCHAEFER) zu einer verstärkten und vermehrten kammersynchronen Impulsaussendung führen. Die Kammersynchrone Impulsaktivierung ist geradezu der Indicator der eingetretenen pharmakologischen Wirkung auf die Herzmuskulatur und muß dieser zeitlich zugeordnet sein. Ein solcher Digitaliseffekt auf die Dehnungsreceptoren kann allerdings nicht als spezifisch betrachtet werden, er ist lediglich die Folge der muskulären Grundwirkung. Ein gleichartiger Erfolg wird bei allen Pharmaka eintreten, die den Kontraktionsablauf beschleunigen und verstärken. Die umgekehrten Erscheinungen können bei einer negativen Beeinflussung des Kontraktionsablaufes erwartet werden. Von solchen pharmakologischen Betrachtungen aus gesehen, gewinnt die Ansicht JARISCHS (1949, 1939) ihre Bedeutung, daß das Herz (wenn auch nicht im Sinne des BEZOLD-JARISCH Reflexes) die jeweilige Größe des Schlagvolumens (besser der Wandspannung) den Zentren meldet und eine kinaesthetische Selbstkontrolle unterhält. In diese Überlegung läßt sich nur schwer die Tatsache einfügen, daß *die Impulsaktivierungen nur kurze Zeit anhielten.* ZOTTERMANN (siehe SCHAEFER) u. SCHAEFER haben die schnelle Adaptation für die Dehnungsreceptoren der Vorhöfe experimentell festgestellt. Diese sind für die absolute Druckhöhe unempfindlich und registrieren nur Druckänderungen. Eine weitere Deutung sei hier versucht: nach MCMICHAEL u. SHARPEY-SCHAEFER kommt es nach intravenösen Gaben von Digoxin in allen Fällen sofort zu einem Absinken des Vorhofsdruckes, auch beim herzgesunden Menschen. Die geringe Füllung des Vorhofes kann in der Weise von Einfluß sein, daß die tangentiale Zerrung seiner Dehnungsreceptoren durch die Kammerkontraktion (tiefer tretende Klappenebene) schwächer ausfällt. Daraus muß im selben Maße, wie die positiv inotrope Kammerwirkung zustande kommt und der Vorhofsdruck abnimmt, die gesteigerte Signalübermittlung zu den Zentren sich wieder herunterregulieren.

Die zweite, aber toxische Wirkung unserer Digitalisstoffe war die *veratrinartige Dauerentladung,* allerdings erst bei einer hohen Einlaufdosis. Bringen wir, wie bei diesem Stoffe die Reizwirkung auf die Hautreceptoren in einen Vergleich zu der Reizwirkung auf die innerlichen Receptoren, dann ist bei der geringeren äußeren Schmerzwirkung der Digitaliskörper eine ebenso geringere innere Reizwirkung zu erwarten. Sie ist grundsätzlich vorhanden, wenn auch nicht so leicht einstellbar wie bei Veratrin. Bei beiden Stoffen scheint die rhythmische mechanische Reizung der sensibilisierten Receptoren durch die Herztätigkeit und durch die atembedingte Zerrung an den Vorhöfen und Venen so langanhaltende Entladungssalven auslösen, daß es durch deren Zusammenfließen zum äußeren Bilde der Dauerentladung kommt. In der Schlußphase der Infusion nahm der Charakter der Dauerentladung ab, und es

erschienen vorübergehend wieder herzsynchrone Perioden, wie auch „atemsynchrone" Entladungsserien. Es ist denkbar, daß die zunehmende Kontraktionsschwächung in der Endphase der Digitalisdauerinfusion nicht mehr alle sensibilisierten Endapparate, oder, falls sie alle noch tätig waren, nicht mehr in gleich starker Weise erregte, so daß auf diese Weise noch vor dem Herzstillstand die Impulshöhen wieder abnahmen, und ihre Frequenz geringer wurde.

Wir haben früher in Übereinstimmung mit Jarisch u. Richter (1939) die Ähnlichkeit von Viscotoxin (Mistelherzstoff), Veratrin, Antiarin und Digitalis betont. Wir finden im toxischen Wirkungsbereich eine neue vergleichbare Komponente, nämlich die Erregung bzw. Sensibilisierung der Herzreceptoren, vor allem vom Typ der Dehnungsreceptoren. Sie gesellt sich zu den anderen gemeinsamen Wirkungskomponenten, z. B. der lokalen Reizwirkung an Haut und Schleimhäuten, die zuletzt in Anästhesie übergeht, der Kontraktionswirkung am quergestreiften Muskel und am Herzmuskel, schließlich auch zu der positiv inotropen „digitalisartigen" Wirkung am insuffizierten Herzen selbst.

Zusammenfassung.

An Katzen wurde die Wirkung von Convallatoxin, k-Strophanthin β und Digitoxin auf die afferenten Nervenaktionsströme in rechten Herzvagusästen untersucht. Bei einem Teil der Versuchstiere ließ sich mit einmaligen, klinisch vergleichbaren intravenösen Dosen ab 2,5 γ/kg Convallatoxin und k-Strophanthin β ein vorübergehender, fördernder Einfluß auf die Frequenz und die Amplitude der vorhofs- und kammersynchronen Aktionsimpulse nachweisen. Der Effekt wurde in Zusammenhang gebracht mit der bekannten positiv inotropen Wirkung dieser Stoffe.

In der Anfangsphase der intravenösen Dauerinfusion ergab sich für diese Stoffe eine gleichartige Aktivierung der vorhof- und kammersynchronen Entladungen. In der toxischen Endphase der Infusion wurden mit Convallatoxin und k-Strophanthin β kontinuierliche Impulsaussendungen beobachtet, wie sie von Veratrin bekannt sind. Für ihr Zustandekommen wird eine Erregbarkeitssteigerung (Sensibilisierung) der sensiblen Endapparate (besonders der Dehnungsreceptoren) gegenüber den mechanischen Kontraktionsreizen angenommen.

Stoffe der Digitalisgruppe sind somit imstande, 2 Wirkungen auszuüben: Einmal verstärkt ihre „therapeutische", muskuläre Grundwirkung die propriozeptive, herzsynchrone Impulsaussendung, zum andern kann auf dem Wege einer chemischen Sensibilisierung der Herzreceptoren eine kontinuierliche Impulsaussendung auftreten, die die toxische Schädigung des Herzens den Zentren meldet.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Unterstützung der Arbeit.

Literatur.

Blumberger, H. J.: Klin. Med., Wien **137**, 591 (1940) — Klin. Wschr. **1940**, 825. — Jarisch, A.: Wien. Klin. Wschr. **1949**, 61. — Jarisch, A., u. H. Richter: Klin. Wschr. **1939**, 185. — McMichael, J., u. E. P. Sharpey-Schafer: Quart J. Med. **4**, 123 (1944); Zit. nach Neumann, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **208**, 87 (1949). — Schaefer, H.: Erg. Physiol. **46**, 71 (1950). — Sarre, H., u. Meilinger: Dtsch. Arch. klin. Med. **188**, 258 (1942). — Klin. Wschr. **1943**, 135. — Wagner, R.: Klin. Wschr. **1950**, 527. — Wagner, R.: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforschg **13**. Tg. S. 7 (1940). — Walton, R. P., J. S. Leary a. H. P. Jones: J. of Pharmacol. **98**, 346 (1950). — Zipf, H. F., u. H. Miestereck: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 456 (1953). — Zipf, H. F., u. H. Ehrlicher: Arch exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 529 (1951).

Prof. Dr. H. F. Zipf, Pharmakol. Institut d. Univ. Bonn, Reuterstr. 2b.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 76—90 (1953).

Sterling-Winthrop Research Institute, Rensselaer, New York.

The Effect of Changes in Molecular Configuration on Inhibitory Sympathomimetic Action.

By

A. M. Lands and M. L. Tainter*.

With 1 figure in the text.

(Eingegangen am 28. Februar 1953.)

The early investigations of Loewi (1921, 1924, 1936) established the importance of humoral agents in the transmission of nerve impulses from autonomic nerve endings to the effector organs. It was shown further that the substance liberated upon stimulation of sympathetic nerves has properties identical to those of epinephrine (Loewi, 1936). The inhibitory actions of epinephrine are well known and much research has indicated the existence of a special receptor mechanism for these effects (Dale, 1906; Dale and Richards, 1927; Ahlquist, 1948; Lands, 1952).

Barger and Dale (1910) have suggested that the primary amines are imperfect sympathomimetic substances in that they possess little inhibitory action, their effects being mainly excitatory. Investigations of arterenol (noradrenalin) derivatives in which the N has been substituted by groups larger than methyl have disclosed an enhanced inhibitory action in the absence of sympathetic excitatory effects (except for the heart) (Konzett, 1940; Lands *et al.*, 1947, 1948, 1950a, 1950b). The results of these investigations emphasize the importance of "two carbon" groups in the N-alkyl group for greatest inhibitory action. There is a progressive increase in inhibitory potency when the hydrogen atoms of the N-methyl group of epinephrine are replaced by other methyl groups, the increase in effectiveness being in the order methyl $<$ ethyl $<$ isopropyl $<$ *t.* butyl (Lands *et al.*, 1948, 1950a, 1950b). Other substitutions are effective and recent investigations have shown that phenyl-*sec.* butyl is particularly favorable for inhibitory action (Wiemers, 1951). Likewise the number of carbon atoms in the hydroxyalkylamine side chain influences inhibitory action with 2 carbons $>$ 4 carbons (Lands *et al.*, 1950b).

Isopropylarterenol (Isuprel, Aludrin) and related compounds are sympathomimetic inhibitory agents. They act on epinephrine sensitive structures but differ from epinephrine in that they do not cause excitation (except in the heart). They are not blocked by adrenolytic drugs or by large doses of atropine. Luduena *et al.* (1949) have shown that not only is the vascular smooth muscle relaxed by isopropylarterenol in the atropinized dog, but that cocaine induced contracture of the retractor penis is also readily relaxed by this drug, an effect which is not influenced by atropinization. A comparison of the various actions of epinephrine and isopropylarterenol has been described in some detail in recent publications (Lands, 1949, 1952).

* In honor of Prof. O. Loewi on his 80th birthday.

The purpose of this communication is to describe results obtained in an investigation of the effects of structural modification of the fundamental sympathomimetic amine molecule on sympathetic inhibitory potency.

Experimental Methods.

Bronchodilator action in guinea pigs was studied by lung perfusion. Lungs were perfused through the trachea by the method of SOLLMAN and VON OETTINGEN as modified by TAINTER, PEDDEN and JAMES (1934). Histamine acid phosphate was injected directly into the perfusion cannula just above the lungs. A dose of 0,05 to 0,3 mgm. was sufficient in most experiments to reduce the rate of flow by 50 per cent. The bronchodilator drug was injected with the bronchoconstrictor dose of histamine. Injections were made in the order: histamine alone, histamine plus bronchodilator drug, histamine alone. The dose of bronchodilator drug was adjusted to obtain that which would just prevent the histamine bronchoconstriction. The results obtained have been compared with those obtained with isopropylarterenol and bronchodilator potency expressed in terms of the activity of the latter drug.

Mean carotid blood pressure was recorded with a mercury manometer in dogs anesthetized with intravenous 'Pentothal' followed by sodium barbital. The sympathomimetic drugs were injected into the exposed femoral vein. In a few experiments, injections of some sympathomimetic drugs were made intramuscularly in trained unanesthetized dogs and blood pressure determined by the method as described by SIEGMUND, NASH and GRANGER (1948) which is an adaptation of the usual clinical method. With most dogs, this method gives quite satisfactory results inasmuch as the pulse in the pedis dorsalis artery is quite distinct.

Acute intravenous toxicities were determined in albino mice (Webster strain 20 ± 2 gms.) by the method of HOPPE, SEPPELIN and LANDS (1949). All drugs were dissolved in distilled water and injected into a tail vein at the rate of 1,0 cc. per minute. Groups of 10 or more animals were injected at each dose level with doses arranged at equal logarithmic intervals. The injected survivors were housed in groups in wire screen cages in a room where the temperature was maintained at 24,5° C. The approximate LD_{50} was calculated by the method of MILLER and TAINTER (1944) and was based on the total mortality at 24 hours.

Results.

1. Substitution of the benzene ring.

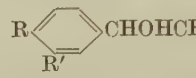
Bronchodilatation may be used as one measure of the intensity of inhibitory sympathomimetic action. Results obtained by perfusion of isolated guinea pig lungs are shown in table 1. The unsubstituted compound, 1-phenyl-2-isopropylaminoethanol (WIN 5528), is a weak bronchodilator agent.

Substitution in the ring with a hydroxyl in the *para* position (WIN 833) increases bronchodilator action approximately two-fold; by a *m.*-hydroxyl group (WIN 5507) approximately ten-fold. Greatest bronchodilator action is obtained when there are hydroxyls at both the *meta* and *para* positions (isopropylarterenol). Substitution of the ring by fluorine (WIN 5505) or an amine group (WIN 5503) in the *meta* position is unfavorable for bronchodilator action.

Sympathetic inhibitory (vasodepressor) action following intravenous injection into anesthetized dogs has been compared with bronchodilator action (table 1).

Vasodepressor action, in order of decreasing effectiveness, is WIN 833 > WIN 5507 > WIN 5505 > WIN 5528. It should be noted that the *m.*-hydroxyphenyl compound (WIN 5507) is somewhat less potent than the corresponding *p.*-hydroxy analog (WIN 833). This is in contrast to bronchodilator data obtained by lung perfusion. Substitution of a fluorine atom in the *meta* position increases vasodepressor potency but this increase is clearly less than that following hydroxy substitution.

Table 1. *The effect of ring substitution of 1-phenyl-2-isopropylaminoethanol on sympathetic inhibitory action.*



Compound No.	Structure R	Structure R′	Vasodepressor[1] action	Bronchodilator[2] action
WIN 5528	H	H	1/500	1/800
WIN 833	OH	H	1/200	1/400
WIN 5507	H	OH	1/300	1/ 80
WIN 5505	H	F	1/325	inactive
WIN 5503	H	NH_2	> 1/1000	constricts
Isuprel (Aludrin) .	OH	OH	1	1

[1] Changes in blood pressure following intravenous injection into barbitalized dogs.

[2] Perfused guinea pig lungs in which constriction was induced by histamine.

Greatest inhibitory action is obtained when there are hydroxyls at both *meta* and *para* positions.

2. *Modification of the N-alkyl substituent.*

The most potent bronchodilator drugs are obtained when the N-alkyl substituent is cyclopentyl or isopropyl. An increase in the size of the alkyl substituent beyond isopropyl diminishes bronchodilator action (table 2, group A).

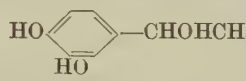
Substitution of the N-methyl by additional methyl groups favors bronchodilatation, as illustrated by the difference in potency between the *t.*-butyl (WIN 5563 and isobutyl WIN 5595) analogs. The former is 2,5 times more potent than the latter. The cyclopentyl group is particularly favorable for this sympathomimetic inhibitory action being somewhat more active than isopropylarterenol (Isuprel) and 16 times more active than the higher homolog, WIN 5589, in which the substituent is cyclohexyl (table 2, group B).

Bronchodilator action of unbranched N-alkyl substituted compounds is greatest with ethyl (WIN 5564) and amyl (WIN 5596) derivatives (table 2, group C). In the absence of an alkyl group on the N (arterenol) bronchodilator action is weak. The activity of the N-alkyl analogs is: methyl (epinephrine) < ethyl = amyl > propyl > butyl. The isopropyl group might be considered as a substituted methyl

which then provides the following sequence: methyl < ethyl < isopropyl > *t.*-butyl. The optimum configuration is obtained with isopropyl.

Evaluation of vasodepressor action is made difficult by simultaneous cardiac acceleration with a resultant increased cardiac output which tends to oppose the fall in blood pressure. However, the results shown in table 2 will serve to indicate in an approximate manner the relative vasodepressor action of this series of sympathomimetic inhibitory compounds. Maximum potency was obtained with isopropyl- and *t.*-butyl-arterenol.

Table 2. *The effect of varying the N-substituent on sympathetic inhibitory and cardiac accelerator actions.*



Compound No.	Structure R	Bronchodilator[1] action	Vasodepressor[1] action	Cardioaccelerator[2] action
A.				
Isopropylarterenol	isopropyl	1	1	1
WIN 5563	*t.*-butyl	1/ 8	1	1/ 2
WIN 5559	*sec.*-butyl	1/ 8	1/ 2	
WIN 5595	isobutyl	1/20	1/13	1/30
WIN 5592	3-amyl	1/ 7	1/25	
WIN 5593	α-methyl-isobutyl	1/ 7	1/25	1/22
B.				
WIN 5591	cyclopentyl	2	1/ 4	1/19
WIN 5589	cyclohexyl	1/ 8	1/30	1/43
C.				
l-Arterenol	H	1/64	weak (LANDS et al., 1950a)	weak
Epinephrine . . .	methyl	1/ 8	1/ 5 (LANDS et al., 1950a)	weak
WIN 5564	ethyl	1/ 4	1/ 2	1/ 3
WIN 5587	propyl	1/ 6	1/ 5	1/ 8
WIN 5590	butyl	1/ 9	1/10	1/12
WIN 5596	amyl	1/ 4	1/ 4	1/11

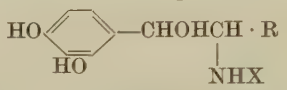
[1] See footnotes, table 1.

[2] Determined in anesthetized dogs by palpation.

Activity of the series of branched substituents (table 2, group A) was as follows: isopropyl = *t.*-butyl > *sec.*-butyl > isobutyl > 3-amyl = α-methyl-isobutyl. The N-cyclopentyl analog (WIN 5591) is clearly more potent than the N-cyclohexyl compound (WIN 5589) but less potent than the *sec.*-butyl compound (WIN 5559). Vasodepressor actions obtained with compounds in group C, table 2, parallel closely those obtained in bronchodilator tests. Their potencies arrange them in the order: H (arterenol) < methyl (epinephrine) < ethyl > propyl = amyl > butyl. The most potent compounds are obtained when the N-alkyl substituent is small (isopropyl, *t.*-butyl, ethyl) or compact (cyclopentyl).

Cardiac stimulation appears to be associated with bronchodilatation and vasodepressor action. As for the above actions, greatest cardiac accelerating potency was found with isopropyl, *t.*-butyl and ethyl substitutions and least with cyclohexyl and isobutyl substitutions. It seems probable that the receptor mechanism involved in this action is not identical with that for sympathomimetic inhibitory action inasmuch as the potent inhibitory compound, cyclopentyl-arterenol (WIN 5591), is clearly less stimulating to the heart than the *t.*-butyl analog whereas bronchodilator action of the former is 16 times greater than the latter.

Table 3. *The effect of varying the length of the side chain of 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-alkyl amino alkanols on the blood pressure of anesthetized dogs.*



Compound No.	Structure R	Bronchodilator[1] action	Vasodepressor[1] action
X = Isopropyl			
Isuprel	H	1	1
WIN 5570	methyl	< 1/1000	1/ 80
WIN 3046	ethyl	1/2.5	1/ 16
WIN 3204	isopropyl	1/1000	< 1/3000
WIN 3243	propyl	< 1/1000	< 1/3000
X = Cyclopentyl			
WIN 5591	H	1½—2	1/ 3
WIN 3357	methyl	< 1/1000	1/ 50
WIN 515	ethyl	1	1/ 14
WIN 3434	isopropyl	< 1/1000	Slightly pressor
WIN 3242	propyl	1/1000	1/2000
X = Cyclohexyl			
WIN 5589	H	1/ 10	1/ 30
WIN 514	methyl	1/ 100	1/ 500
WIN 713	ethyl	1/ 7	1/ 500
WIN 3269	propyl	< 1/1000	1/4000
X = H			
Arterenol	H	1/ 75	pressor
Cobefrine	methyl	1/ 100	pressor
Butanefrine	ethyl	1/ 100	1/ 200
WIN 3356	propyl	< 1/1000	pressor

[1] See footnotes, table 1.

In a few instances, blood pressure and pulse rate changes were determined in unanesthetized dogs following intramuscular administration of the sympathomimetic amine. Isopropylarterenol, in doses of 2.2 microgm./kgm. increased pulse rate 80—124 per cent and reduced blood pressure 6—40 mm. Hg. The cardiac stimulating action of cyclopentylarterenol (WIN 5591) was less than for the above. At the same

dose, the increases in pulse rate were 38—74 per cent and the reductions in blood pressure 4—16 mm. Hg. The potency of the N-butyl analog (WIN 5590) was found to be equal to that of cyclopentylarterenol.

3. Alkyl substitution of the carbon of l-phenyl-2-isopropylaminoethanol.

The effect of increasing the size of the side chain of compounds in which the substituent on the N is isopropyl, cyclopentyl or cyclohexyl have been compared with the unsubstituted compounds (table 3). Highest sympathomimetic inhibitory potency is obtained with the 2-carbon side chain. Potency diminishes in the order: C-2 > C-4 > C-3 > C-5. It is interesting to note that the 4-carbon is more favorable than the 3-carbon side chain for sympathomimetic inhibitory action. This is in contrast with the results that have been obtained with pressor compounds containing these side chains in which the pressor potency decreases C-2 > C-3 > C-4 (Lands et al., 1950b; Tainter et al., 1934).

As pointed out in the preceding section, N-cyclohexyl substitution is less favorable than isopropyl or cyclopentyl substitutions and this finding applies to all of the above side chains. In the absence of an N-alkyl substitution, inhibitory action is weak. Except with C-4 (Butanefrine, ethylnorepinephrine) this effect is usually obscured by pressor action.

In a few instances, phenolic compounds, with the hydroxyl in either the *meta* or *para* positions, were available to us for pharmacologic evaluation. Lengthening of the side chain diminished activity. Thus the aminoethanol compound, WIN 5507, is more than three times more potent than the corresponding aminopropanol analog (WIN 3294). The presence of a phenolic hydroxyl in the *meta* or *para* position is favorable for depressor action. The unsubstituted compound, WIN 5528, has about one-half the activity of the phenolic analogs, WIN 833 and WIN 5507 (table 4).

4. Modification of the carbinol group of l-phenyl-2-isopropylaminoethanol.

In previous publications, Lands et al. (1948, 1950a) reported that the removal of the alcoholic hydroxyl group from N-isopropylarterenol greatly reduced bronchodilator and other inhibitory sympathomimetic actions. An additional series of derivates have been investigated in an effort to determine the importance of the carbinol group for inhibitory action. The vasodepressor response following intravenous injection into barbitalized dogs has been used as the basis for evaluation. Results obtained are shown in table 4.

Examination of these data suggest that 1-phenyl-2-isopropylaminoethane (WIN 5523) is a weak vasodepressor compound and that potency is approximately doubled and greatly prolonged by conversion to the corresponding aminoalcohol (WIN 5528). The introduction of an alcoholic group appears to be more important for inhibitory action than the introduction of either of the phenolic groups, inasmuch

as the 4-hydroxy analog (WIN 5565) is inactive and the 3-hydroxy analog (WIN 5586) is less active than WIN 5528. The dihydroxyphenylethylamine derivative (WIN 5571) is a weak pressor agent whereas the 3-hydroxyphenyl analog (WIN 5586) has a weak depressor action. Both 3- and 4-hydroxy substitution of the ring of 1-phenyl-2-isopropylaminoethanol (WIN 5528) results in active vasodepressor compounds of comparable potency (WIN 833 and WIN 5507).

Table 4. *The effect of modifying the carbinol group of various derivatives of 1-phenyl-2-isopropylaminoethanol on the vasodepressor action in anesthetized dogs following intravenous injection.*

Compound No.	Structure R_1	R_2	R_3	Vasodepressor[1] action
WIN 5523 . .	H	H	H	1/1000
WIN 5528 . .	H	H	OH	1/ 500
WIN 5565 . .	OH	H	H	inactive
WIN 5586 . .	H	OH	H	1/ 800
WIN 833 . .	OH	H	OH	1/ 300
WIN 5514 . .	OH	H	= O	Slightly pressor
WIN 5507 . .	H	OH	OH	1/ 200
WIN 5571 . .	OH	OH	H	Slightly pressor
Isuprel	OH	OH	OH	1

[1] See footnote, table 1.

The corresponding dihydroxyphenyl derivate, Isuprel, is about 200—300 times more active than either WIN 833 or WIN 5507. Increases in activity of this magnitude cannot result from a simple addition of the effects of these three hydroxyl groups but must represent favorable structural arrangement for the sympathetic inhibitory "receptor". The importance of the alcoholic hydroxyl for vasodepressor action is further illustrated by the effect of replacing it by an = 0 group (WIN 5514) in l-(4-hydroxyphenyl)-2-isopropylaminoethanol. This modification abolished depressor action, the dominant effect now being pressor. These data indicate that the structural requirements for vasodepressor action are as exacting as those required for vasopressor action.

5. *Dialkyl substitution of the amino group.*

The data presented in the preceeding sections were obtained with primary and secondary amines. However, this leaves undetermined the possibility that similar sympathomimetic inhibitory action would also be obtained by suitable dialkyl substitution of the amino group. The vasodepressor action of various analogs of l-(4-hydroxyphenyl)-2-aminoethanol have been compared in anesthetized dogs by intravenous injection and the results obtained are shown in table 5. The di-isopropyl

analog of l-(4-hydroxyphenyl)-2-isopropylaminoethanol has very little effect on blood pressure at doses up to 1.0 mgm./kgm. None of the tertiary amines shown in table 5 cause important vasodepression suggesting that dialkyl substitution of the amino group is unfavorable for sympathomimetic inhibitory action.

Table 5. *The effect of dialkyl substitution of the amino group 1-(4-hydroxyphenyl)-2-aminoethanol on vasodepressor action in anesthetized dogs.*

Compound No.	Structure R_1	Structure R_2	Salt	Dose i.v. mgm. base kgm.	Change in blood pressure mm. Hg	Duration of some change min.
WIN 5512 .	H	H	HCl	0.17	+ 46	8
Sympatol .	H	methyl	tart.	0.38	+ 45	8
WIN 5513 .	methyl	methyl	HCl	0.42	+ 5, +13	2
WIN 5562 .	ethyl	ethyl	acet.	0.86	+ 5, —10	2
WIN 5537 .	methyl	isopropyl	HCl	0.86	+ 5, —16	2—5
WIN 5534 .	isopropyl	isopropyl	HBr	0.71	0, —10	2
WIN 5541 .	piperidino		HBr	0.74	+ 5, — 4	2—8
WIN 5566 .	α-pipicolino		acet.	0.79	+27, —10	2—3
WIN 5539 .	morpholino		HBr	0.75	+ 5, — 7	2
WIN 833 .	isopropyl	H	HCl	0.16	— 35	15—>180

Table 6. *The effect of hydrogenation of the phenyl ring of various sympathomimetic amines on blood pressure in anesthetized dogs.*

Compound No.	Structure R_1	Structure R_2	Structure R_3	Dose i.v. mgm. base kgm.	Change in blood pressure mm. Hg	Duration of some change min.
WIN 5529 .	H	phenyl	methyl	0.41	+ 38	3—10
WIN 5581 .	H	cyclohexyl	methyl	1.78	+ 43	3—10
WIN 5528 .	H	phenyl	isopropyl	0.41	— 36	30, >60
WIN 5577 .	H	cyclohexyl	isopropyl	0.41—2.5	inactive	
Sympatol .	OH	phenyl	methyl	0.61	+ 34	5—10
WIN 5580 .	OH	cyclohexyl	methyl	2.80	+ 23	3—10
WIN 833 .	OH	phenyl	isopropyl	0.15	—42	>10
WIN 5579 .	OH	cyclohexyl	isopropyl	1.85	+ 6	5—10
Nor-Sympatol .	OH	phenyl	H	0.17	+ 46	5—10
Tyramine .				0.13	+ 60	2— 5

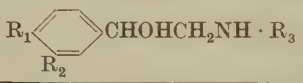
6. The effect of hydrogenation of the phenyl ring of various sympathomimetic amines on cardiovascular action.

Various N-methyl and N-isopropyl derivatives of saturated ring compounds have been compared with their corresponding phenyl analogs for effect on blood pressure. Hydrogenation of the phenyl rings reduces pressor potency (table 6). The cyclohexyl analog of l-phenyl-2-methylaminoethanol is about one-third as potent as the latter in raising blood pressure. The cyclohexyl analog of l-(4-hydroxyphenyl) = 2-methylaminoethanol is almost inactive. Hydrogenation of the phenyl ring does not favor sympathomimetic inhibitory action. Cyclohexyl analogs of active vasodepressor compounds were without vasodepressor action in doses of 0.5—3.0 mgm./kgm.

7. Toxicity.

Acute intravenous toxicity has been determined in albino mice as previously described for other sympathomimetic amines (Hoppe et al., 1949). Results obtained with derivatives of l-phenyl-2-aminoethanol are shown in table 7. Epinephrine is most toxic. Removal of the N-methyl group (l-arterenol) reduces toxicity significantly.

Table 7. *Acute intravenous toxicity of derivatives of 1-phenyl-2-aminoethanol in albino mice.*



Compound No.	Structure R_1	R_2	R_3	Approx LD_{50} mgm./kgm.
WIN 5528	H	H	isopropyl	90
WIN 833	OH	H	isopropyl	144
WIN 5507	H	OH	isopropyl	130
WIN 5505	H	F	isopropyl	90
WIN 5503[1]	H	NH_2	isopropyl	
Isuprel	OH	OH	isopropyl	77
l-Arterenol	OH	OH	H	5
Epinephrine	OH	OH	methyl	2.7
WIN 5564	OH	OH	ethyl	15
WIN 5587	OH	OH	propyl	95
WIN 5590	OH	OH	butyl	85
WIN 5559	OH	OH	*sec.*-butyl	70
WIN 5596	OH	OH	amyl	36
WIN 5591	OH	OH	cyclopentyl	53
WIN 5563	OH	OH	*t.*-butyl	47
Nor-Sympatol	OH	H	H	93
Tyramine				260

[1] Insufficient material for completion of toxicity testing. Intraperitoneal LD_{50} in albino mice is 440 mgm./kgm. Isuprel, by the same method, has an LD_{50} of 494 mgm./kgm.

The N-ethyl derivative is about one-fifth as toxic as epinephrine. N-alkylarterenols with substituents larger than ethyl have comparatively low toxicities. Removal of either the 3-hydroxyl (WIN 833) or the 4-hydroxyl (WIN 5507) groups from the phenyl ring reduces toxicity significantly. It is interesting to note that these compounds are less toxic than the unsubstituted compound (WIN 5528). Fluorine substitution of the ring in the 3-position did not influence toxicity. Data obtained with the 3-aminophenyl analog (intraperitoneal injection) are similar.

Table 8. *The effect of alkyl substitution of the second carbon of 1-phenyl-2-isopropylaminoethanol on acute intravenous toxicity in albino mice.*

Compound No.	Structure R_1	R_2	R_3	Approx. LD_{50} mgm./kgm.
WIN 5528	H	H	H	90
WIN 833	OH	H	H	144
WIN 5507	H	OH	H	130
Isuprel	OH	OH	H	77
WIN 5570	OH	OH	methyl	42
WIN 3046	OH	OH	ethyl	57
WIN 3243	OH	OH	propyl	56
WIN 3204	OH	OH	isopropyl	45

Increase in the length of the side chain has no regular effect on toxicity (table 8). N-isopropylarterenol appears to be somewhat less toxic than its higher homologs (WIN 5570, WIN 3046) although all of these substances have relatively low LD_{50} values. None of the inhibitory sympathomimetic amines described here have high toxicity. The most active derivatives (WIN 5591 and isopropylarterenol) do not differ significantly in their toxicity from the comparatively weak sympathomimetic inhibitory compounds.

Discussion.

General structural requirements important for sympathetic inhibitory action have been reviewed recently (Lands, 1949). Investigation by Lands *et al.* (1950a) have emphasized the importance of the alcoholic hydroxyl for this action. A comparison of various N-isopropyl derivatives of β-phenethylamine has shown that the introduction of an alcoholic hydroxyl at the β-carbon markedly increases vasodepressor action (Lands *et al.*, 1947).

When a ketone replaced the carbinol, significant depressor action (table 4) is abolished. The keto analog of epinephrine (Kephrine, Stryphnone) has little sympathetic inhibitory action. Chen, Wu and Henricksen (1929) have reported weak depressor action with 1-phenyl-2-butylaminoethanol. With derivatives of 1-phenyl-2-aminopropanol, depressor action was observed with N-alkyl substitutions larger than ethyl. A further increase in the length of the side chain to 4 carbon atoms decreased pressor action of the primary amine and its N-methyl analog. Hydroxy substitution of the phenyl ring in the *meta* rather than the *para* position did not influence significantly these actions.

The substitution of fluorene for the *m*-hydroxyl group in 1-(3-hydroxyphenyl)-2-isopropylaminoethanol was without significant effect on depressor action. However, substitution by an amino group reduces this action significantly. This is in general agreement with results obtained with pressor derivatives containing an amino group on the ring. Hartung (1946) has reported 1-(4-aminophenyl)-2-aminopropanol comparable to the 4-hydroxyphenyl analog. However, other derivatives were much less effective. Bovet and Benoit (1942) found 1-(4-aminophenyl)-2-methylaminoethane approximately one-fifth as active as the corresponding unsubstituted compound. Substitution of the ring of epinephrine by a 2-amino group greatly reduces vasopressor action (Mannich and Barger, 1939).

The addition of *m*- and *p*-hydroxyls to the ring of 1-phenyl-2-alkylaminoethanol is most favorable for inhibitory action. The primary amine (arterenol) has small inhibitory action and this action is increased by N-alkyl substitution. With substitutions larger than ethyl, inhibitory action predominates (Konzett, 1940; Lands *et al.*, 1947, 1948, 1950a, 1950b; Wiemers, 1951). In addition to the N-alkyl derivatives disclosed in this communication, (Wiemers, 1951) has shown recently that significant sympathomimetic inhibitory action is obtained by substitution of the amine with various phenyl alkyl groups. As previously pointed out, the alcoholic hydroxyl is important for this inhibitory action. Barger and Dale (1910) stated that the addition of an ethyl or propyl group to the amine of 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-aminoethane reduced but did not abolish pressor action. The corresponding -2-aminoethanols are strongly depressor (table 2). Similarly, these investigators reported the N-ethyl, -propyl, -amyl and -hexyl analogs of the corresponding ketone distinctly pressor.

We have found that an increase in the size of the side chain diminished both excitatory and inhibitory sympathomimetic activity (table 3). There is a distinct reduction in the pressor potency of 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-aminoethanol as the length of the side chain is increased to 3 or 4 carbon atoms (Tainter, 1931; Morton and Tainter, 1940). There is also a progressive reduction in depressor and bronchodilator action as the length of the side chain is increased. Arranged in the order of decreasing potency they are: hydroxyethylamine, -2-butylamine, -2-propylamine, -2-amyl and -2-(3-methyl)butylamine. The last two compounds are almost inactive. Similar results were obtained with the N-cycloalkyl derivatives. With the exception of the N-cyclohexyl derivatives, the propanol analogs are distinctly less active than either the ethanol or butanol analogs. This was not observed with the corresponding primary amines. Derivatives with the longer side chains are almost inactive.

The tertiary amines, 4-hydroxyphenethyldimethylamine (hordenine) and 1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-dimethylaminoethanol (methadrene) are weak excitatory sympathomimetic drugs (Tainter, 1932; Stehle *et al.*, 1936, 1937). Substitution of the amino group by groups larger than methyl results in compounds having little or no activity (table 5). The tertiary amino analog of the active vasodepressor compound (WIN 833) is not more effective than other tertiary amines used in this investigation.

It has been previously reported that saturation of the phenyl ring of various sympathomimetic amines decreases pressor potency (Gunn and Gurd, 1940; Marsh, 1948; Lands *et al.*, 1945, 1947, 1952). Similar results have been obtained by us with 1-phenyl-2-methylaminoethanol, 1-(4-hydroxyphenyl)-2-methylaminoethanol and the corresponding cyclohexyl analogs (table 6). The N-isopropyl analogs of these cyclohexyl derivatives were without significant effect on blood pressure. Hydrogenation of the phenyl ring abolished vasodepressor action.

The data presented here suggests that the structural requirements for inhibitory sympathomimetic action are as specific as those for

excitatory sympathomimetic action. Relatively small changes in molecular structure may greatly diminish or abolish this effect. Some of the modifications favorable for excitatory action are also favorable for inhibition, resulting in the apparent paradox of a molecule exerting opposite effects on a single effector organ. However, the threshold for these opposing actions differs in different organs and may vary in the same organ when conditions are changed. Epinephrine, in low concentration, may cause vasodilatation. Similarly, epinephrine usually diminishes tonus of the stomach and intestine but may increase the tonus of the sphincters (Smith, 1918; Carlson, 1922). If tonus is low, the effect usually is to increase it (Carlson, 1922). Thus we may speak of patterned responses to epinephrine involving both excitation and inhibition, these patterns having physiologic utility.

The case for epinephrine-like sympathomimetic drugs is simpler and at the same time more complex. The pattern of response to isopropylarterenol involves inhibitory effects in many organs (blood vessels, intestine, uterus, etc.), along with strong excitatory effects on the heart. Cardiac stimulation associated with a moderate reduction in peripheral resistance would decrease circulation time and increase minute volume. Blood sugar is not elevated or the pupil dilated. The physiologic utility of this pattern is not readily apparent. Inasmuch as blood sugar is not elevated (McChesney et al., 1949), the effect on the carbohydrate cycle is either not important or differs from that following the injection or secretion of large amounts of epinephrine. However, further investigation of the role of this new drug may establish a definite function for it in the "carbohydrate cycle".

A substance similar to N-isopropylarterenol might be normally formed to support the effects of epinephrine in those organs where sympathetic inhibitory action is dominant. Recent research has shown that l-arterenol is an immediate precursor in the synthesis of epinephrine (Blaschko, 1942). It would seem not improbable that under suitable conditions an ethyl, isopropyl or other group might be substituted for the methyl group which is added in the synthesis of epinephrine and that these higher homologs would be used to facilitate the inhibitory effects which characterize the action of epinephrine in these organs. The most obvious feature of the N-isopropylarterenol response is the increase in cardiac action along with a decrease in peripheral resistance, to create conditions favorable for more rapid circulation. Simultaneous bronchodilatation would reduce resistance in the bronchial tree and thus facilitate the oxygenation of a larger volume of blood.

The term "sympathomimetic amine" would have more descriptive significance if it were defined as being either excitatory, inhibitory or amphibolic indicating actions mediated through a sympathetic

excitatory (Ac) or a sympathetic inhibitory (Ar) receptor mechanism (Lands, 1952).

Epinephrine and arterenol are amphibolic sympathomimetic amines inasmuch as they may either stimulate or inhibit sympathetically innervated organs, the nature of the response being governed by the concentration of drug at the receptor surface and, possibly, the relative number of each type of receptor. The recent investigations of Folkow *et al.*, (1948, 1950) have suggested that the sympathetic vasodilator fibers in the cat are cholinergic. Bülbring and Burn (1935) have shown that stimulation of sympathetic chain supplying the hind limbs of the dog produces a

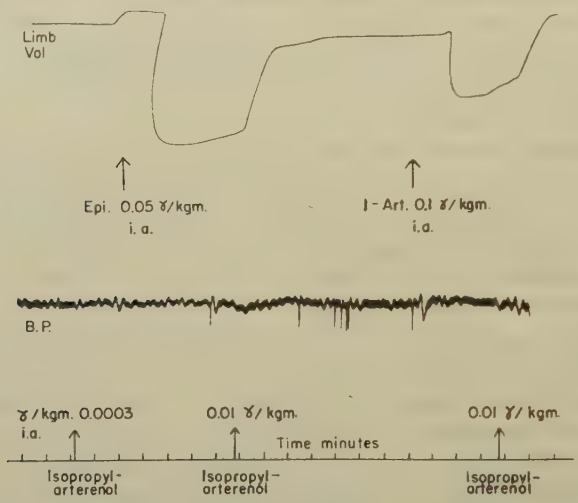


Fig. 1. Effect of isopropylarterenol on the intramuscular vascular bed. From above downward; (Limb Vol) changes in volume of the skinned hind limb of the anesthetized dog; (B. P.) carotid blood pressure; time in minutes. All drugs were injected directly into the femoral artery supplying the skinned limb. Epinephrine and l-arterenol caused vasoconstriction which was promptly reversed by isopropylarterenol.

dilator effect which is intensified by eserine and abolished by atropine. However, these investigators observed that the vasodilator effect of small doses of epinephrine after ergotoxine is not affected by atropine.

In the experiments reported in this communication, we have routinely atropinized the test animals without affecting the vasodilator action of isopropylarterenol and related compounds. It might be reasoned that these vasodepressor responses resulted from an effect in a limited vascular area, possibly the splanchnic region, and was not characteristic of other vascular beds. That this is not the case can be seen from examination of the results shown in Fig. 1.

In this experiment the dog was anesthetized with barbital sodium and completely atropinized. The skin along with the foot of one hind limb was removed, the skinned portion, consisting largely of muscle, was enclosed in an oncometer and changes in volume recorded by means of a piston recorder.

The intra-arterial injection of epinephrine or arterenol caused a prompt reduction in limb volume indicating marked vasoconstriction. Isopropylarterenol in intra-arterial doses of 0.0003—0.01 microgm./kgm. caused a prompt increase in limb volume. This could be demonstrated readily after constriction with either epinephrine or l-arterenol. It should be noted that the latter was distinctly less vasoconstrictor than the former when administered in this manner. There are receptor mechanism in the muscle vascular bed of the dog hind limb which may mediate vasodilatation or vasoconstriction and these are not affected by atropinization. It would seem that in the dog, the intramuscular vascular bed may contain both cholinergic and adrenergic vasodilator mechanisms although the former may play the dominant role in the control of vascular tonus. In general, cardiac effects do not correlate with other sympathomimetic actions, this organ being stimulated by most sympathomimetic amines. If one assumes that the cardiac receptor mechanism is undifferentiated (an Acr), mediating excitation only, the observed effects of the various drugs is more easily understood. The cardiac actions of arterenol may be considered to result from strong stimulation of the Ac component and N-isopropyl substitution would increase this effect by adding the stimulating effect of the "r" component.

Summary.

1. Epinephrine-like substances may exert an excitatory, inhibitory or amphibolic sympathomimetic action on sympathetically innervated visceral organs. This classification does not extend to the heart where sympathetic actions, if any, are always excitatory.

2. The most effective inhibitory sympathomimetic amines contain the catechol nucleus, an alcoholic hydroxyl and an N-alkyl substituent larger than methyl.

3. The substitution of fluorine for the phenolic hydroxyl in l-(3-hydroxyphenyl)-2-isopropylaminoethanol does not significantly alter inhibitory sympathomimetic action. Substitution by a 3-amino group diminishes depressor action, this derivative being less active than the unsubstituted phenyl analog.

4. Replacement of the alcoholic hydroxyl by H or an oxygen greatly diminishes or abolishes inhibitory sympathomimetic action.

5. Greatest inhibitory sympathomimetic action is obtained when the N-alkyl substituent is isopropyl, *t.*-butyl or cyclopentyl.

6. An increase in the length of side chain of l-phenyl-2-alkylaminoalkanols causes a reduction in inhibitory sympathomimetic action. This reduction is in the order: ethanol, butanol, propanol, pentanol, 3-methylbutanol.

7. Dialkylamino analogs of l-(4-hydroxylphenyl)-2-aminoethanol do not cause inhibitory sympathomimetic responses.

8. Hydrogenation of the phenyl ring abolishes inhibitory sympathomimetic action.

9. The inhibitatory sympathomimetic amines used in this investigation are much less toxic than epinephrine or l-arterenol.

Literature.

Ahlquist, R. P.: Amer. J. Physiol. **153**, 586 (1948). — Barger, G., and H. H. Dale: J. of Physiol. **41**, 19 (1910–11). — Blaschko, H.: J. of Physiol. **101**, 337 (1942). — Bovet, D., and G. Benoit: C. r. Soc. Biol. Paris **136**, 328 (1942). — Bülbring, E., and J. H. Burn: J. of Physiol. **83**, 483 (1935). — Carlson, A. J.: Amer. J. Physiol. **61**, 14 (1922). — Chen, K. K., Chang-Keng Wu and E. Henricksen: J. of Pharmacol. **36**, 363 (1929). — Dale, H. H.: J. of. Physiol. **34**, 163 (1906). — Dale, H. H., and A. N. Richards: J. of Physiol. **63**, 201 (1927). — Folkow, B., J. Frost and B. Uvnäs: Acta physiol. Scand. **15**, 412 (1948). — Folkow, B., and B. Uvnäs: Acta physiol. Scand. **20**, 329 (1950). — Gunn, J. A., and M. R. Gurd: J. of Physiol. **97**, 453 (1940). — Hartung, W. H.: J. Amer. Pharmaceut. Assoc. **35**, 15 (1946). — Hoppe, J. O., D. K. Seppelin and A. M. Lands: J. of Pharmacol. **95**, 502 (1949). — Konzett, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **197**, 27 (1940); **197**, 41 (1940). — Lands, A. M.: Pharmacol. Rev. **1**, 279 (1949). — Amer. J. Physiol. **169**, 11 (1952). — Lands, A. M., and J. I. Grant: J. of Pharmacol. **106**, 341 (1952). — Lands, A. M., J. R. Lewis and V. L. Nash: J. of Pharmacol. **83**, 253 (1945). — Lands, A. M., F. P. Luduena, E. Ananenko and J. I. Grant: Arch. internat. Pharmacodynamie **83**, 602 (1950a). — Lands, A. M., F. P. Luduena, J. I. Grant and E. Ananenko: J. of Pharmacol. **99**, 45 (1950b). — Lands, A. M., V. L. Nash, B. L. Dertinger, H. R. Granger and H. M. McCarthy: J. of Pharmacol. **92**, 369 (1948). — Lands, A. M., V. L. Nash, H. R. Granger and B. L. Dertinger: J. of Pharmacol. **89**, 382 (1947). — Lands, A. M., E. E. Richards, V. L. Nash and K. Z. Hooper: J. of Pharmacol. **89**, 297 (1947). — Loewi, O.: Pflügers Arch. **193**, 201 (1921); **203**, 408 (1924); **204**, 361 (1924); **237**, 504 (1936). — Loewi, O., and E. Navratil: Pflügers Arch. **206**, 135 (1924); **214**, 678 (1926). — Luduena, F. P., E. Ananenko, O. H. Siegmund and L. C. Miller: J. of Pharmacol. **95**, 155 (1949). — Mannich, C., and G. Barger: Arch. Pharm. **277**, 117 (1939). — Marsh, D. F.: J. of Pharmacol. **93**, 338 (1948). — McChesney, E. W., J. P. McAuliff and H. Blumberg: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **71**, 220 (1949). — Miller, L. C., and M. L. Tainter: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **57**, 261 (1944). — Morton, M. C., and M. L. Tainter: J. of Physiol. **98**, 263 (1940). — Siegmund, O. H., V. L. Nash and H. R. Granger: J. of Pharmacol. **92**, 207 (1948). — Smith, M. L.: Amer. J. Physiol. **46**, 232 (1918). — Stehle, R. L., and H. C. Ellsworth: J. of Pharmacol. **59**, 114 (1937). — Stehle, R. L., K. I. Melville and F. K. Oldham: J. of Pharmacol. **56**, 473 (1936). — Tainter, M. L.: Arch. internat. Pharmacodynamie **41**, 365 (1931); **42**, 128 (1932); **46**, 192 (1933). — Tainter, M. L., J. R. Pedden and Martha James: J. of Pharmacol. **51**, 371 (1934). — Wiemers, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 283 (1951); **213**, 314 (1951).

Dr. M. L. Tainter, Sterling-Winthrop Research Institute, Rensselaer, New York.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 91—99 (1953).

Research Laboratories, Ciba Pharmaceutical Products, Inc. Summit, N. J.

Steroids which prevent cortisone from causing atrophy of the adrenal*.

By

ROBERT GAUNT, CONSTANCE H. TUTHILL, NANCY ANTONCHAK and ERNST OPPENHEIMER.

(Eingegangen am 23. Februar 1953.)

Several workers[1, 4, 5, 6, 10] have shown that testosterone and other steroids have a limited effect in preventing the adrenal atrophy resulting from hypophysectomy. WINTER, HOLLINGS and STEBBINS[8, 9], GAUNT, HOWELL, ANTONCHAK and LEATHEM[2, 3] and ZIZINE[11] found that methyl-androstenediol or testosterone propionate prevented partially or completely the adrenal atrophy which follows cortisone treatment. The work from our laboratory included observations on numerous other substances. Several C-19 and C-20 steroids were found to antagonize the adrenal-inhibiting effect of cortisone, whereas all the C-21 steroids tried were either weak or ineffective. It was observed[3, 9] that adrenal weight maintenance was associated with the maintenance of essentially normal sudan-staining adrenal lipids. Except for the zona glomerulosa, the adrenals of animals treated with cortisone alone were almost devoid of stainable lipid. Under the conditions used the steroids antagonizing the effects of cortisone had little, if any, effect on the adrenal when given alone. It is known, however, that several of them will cause adrenal atrophy if given in sufficient dosage and for sufficient time[7].

The work reported here is an extension of the above-mentioned studies and was conducted for the following purposes: 1. To explore the actions of selected additional compounds with the hope of being able to define the characteristic chemical structure of the steroids requisite for the observed antagonism to cortisone; 2. to determine which of the active steroids were most effective in preventing cortisone inhibition of the adrenal; 3. to ascertain whether the action of cortisone could be antagonized over a long period of time; and 4. to compare the action of estrogenic compounds to those of non-estrogenic steroids with respect to their influence on the adrenal.

Methods.

With the exception of the animals shown in Table 4 all observations were made on male rats weighing approximately 60 grams at the beginning of the experiment. Unless otherwise stated treatment was given for seven days, autopsies were

* In honor of Dr. O. LOEWI on his 80th birthday.

performed on the eighth day and all steroids were given in microcrystalline aqueous suspension. Cortisone acetate was always given daily in a dose of 1 mg. subcutaneously. Adrenals were trimmed, weighed, preserved in 10 per cent formalin and stained with sudan black B. The amount of adrenal lipid, based on the amount of sudan-stained material, was graded by one observer on an arbitrary scale of zero to four in three representative sections from each gland. Zero meant that no sudan-stained material was present. A grade of four was given to intensely stained sections containing more stainable lipids than usually present in untreated animals. The average of the three sections was recorded for the gland as a whole and group averages included in the tables as an "Index of Sudanophilia".

Results.

For interpretation of the new data reported here it is necessary to have a summary of previous findings. These are shown in Table 1 taken from the data of Gaunt, Tuthill, Antonchak and Leathem[3].

New Compounds Studied: From Table 2, Series I, it may be seen that progesterone had no significant adrenal-depressing effect in these short-term experiments. When given with cortisone it had only a weak, if any, effect in antagonizing the adrenal-depressing effect of cortisone. This result also could have been expected from the experience with other C-21 steroids (Tables 1 and 2) and from the similar work of Zizine[11] on progesterone itself.

4-androsten-3-one produced no observed effects when given alone or with cortisone (Table 2, Series I). It is of interest that this compound apparently lacked androgenic activity as indicated by seminal vesicle weights.

3 β-methoxy-17 α-methyl-5-androsten-17 β-ol, the methyl ether of MAD*, antagonized cortisone to a considerable degree but less than did MAD itself (Table 2, Series II). 3 β-methoxy-5-androsten-17 β-ol was almost inactive (Table 2, Series II) in contrast to 5-androsten-3 β, 17 β-diol (Table 1).

The C-21 steroids, ethinyl testosterone (Table 2, Series II) and pregnenolone (Table 2, Series III), were inactive as was the 3 methyl ether of the latter compound (3 β-methoxy-5-pregnen-20-one).

Estrogenic Substances: As noted in Table 1, it had previously been found that estradiol benzoate in oil given in doses of 10γ per day had some ability to antagonize the adrenal-depressing and body growth-depressing effects of cortisone. A comparison was then made of the effects of the strong estrogen, β-estradiol, the weak estrogen α-estradiol, and the strong estrogen of different chemical structure, diethylstilbestrol. These compounds were given in 100 γ daily doses to determine whether more marked effects could be obtained than with the small doses of estradiol benzoate used initially.

* MAD = 17 α-methyl-5-androstene-3β, 17β-diol.

Table 1. *Summary of previous data on effect of cortisone alone and in combination with other steroids on adrenal weight* *

Treatment**	Adrenal Wt. mg.	Adrenal Wt. mg./100 gm.	No. Rats
None	20,3	21,0	32
Cortisone Alone	7,7	11,2	33
Cortisone plus the following:			
17 β-hydroxyandrostan-3-one (dihydrotestosterone)	17,1	23,4	10
17 α-methyl-17 β-hydroxyandrostan-3-one (methyldihydrotestosterone)	18,8	23,3	10
17 α-methyl-5-androstene-3 β, 17 β-diol (MAD)	17,1	22,3	10
17 α-methyltestosterone	16,0	21,6	10
17 β-methoxy-4-androsten-3-one (Testosterone methyl ether)	16,1	21,5	10
Testosterone Propionate	15,7	20,8	10
5-androstene-3 β, 17 β-diol	14,2	20,7	10
17 α-methyl-3 β, 17 β-androstanediol	15,1	20,7	10
Androstane-3 α, 17 β-diol	14,1	19,9	10
17 α-methylandrostan-17 β-ol	12,7	18,0	10
Estradiol benzoate — 10 γ/day, oil solution	12,5	17,4	12
Dehydroisoandrosterone	12,0	16,1	10
17 α-ethylandrostane-3 β, 17 β-diol	10,8	15,4	10
17 α-ethyltestosterone	10,0	14,0	10
17 α-vinyltestosterone	9,7	12,8	10
17 α-ethyl-5-androstene-3 β, 17 β-diol	9,3	12,7	10
3 β-methoxy-5-androsten-17-one (Dehydroisoandrosterone methyl ether)	8,5	12,1	10
17 α-vinyl-5-androstene-3 β, 17 β-diol	7,8	11,6	10

* Taken from the data of Gaunt *et al*[9] by permission of the editors of *Endocrinology*.

** All dosages were: 1 mg Cortisone + 2 mg of other steroids (except Estradiol benzoate) per day for 7 days.

Surprisingly, only slight, if any, effects on the actual adrenal weights were obtained when these compounds were given with cortisone. Relative adrenal weight was increased by the two active estrogens, β-estradiol and diethylstilbestrol, but that was associated with a marked depression in body weight (Table 2, Series IV). Adrenal lipids were only slightly better maintained when the estrogens were given with cortisone than when the latter compound was given alone.

The original work with estradiol benzoate in oil was then repeated at daily doses of 10 γ and 100 γ. β-estradiol in oil was also given at a 10 γ

Table 2. *Effect of various steroids on Adrenal weight and Sudanophilia when given alone and with cortisone.*

(Daily Dosage: Cortisone acetate — 1 mg/day;
other Steroids — 2 mg/day, unless otherwise stated.)

Treatment	Adrenal Weight mg/100 gm.	Adrenal Weight mg.	Index of Sudanophilia	% Weight Gain	Seminal Vesicle mg/100 gm.	No. Rats
Series I						
Controls — untreated . .	26,3 ± 1,88	22,3	2,7	56 ± 4,9	10,3	6
Cortisone	12,8 ± 1,53	8,7	0,6	23 ± 3,2	12,1	6
Progesterone	23,2 ± 2,06	20,8	2,6	60 ± 3,8	14,5	6
Above + Cortisone . . .	15,8 ± 1,60	9,4	0,6	21 ± 4,9	29,0	5
4-androsten-3-one	25,9 ± 0,97	21,6	2,3	56 ± 3,5	12,0	6
Above + Cortisone . . .	12,8 ± 0,72	8,3	0,8	20 ± 4,7	12,1	6
Series II						
Controls — untreated . .	25,0 ± 1,06	24,9	2,7	67 ± 3,8	12,0	6
Cortisone	12,9 ± 1,03	8,7	0,7	25 ± 3,4	14,0	6
3 β-methoxy-17 α methyl-5-androsten-17 β-ol . .	20,8 ± 1,02	19,7	1,8	64 ± 3,9	56,5	6
Above + Cortisone . . .	17,4 ± 2,08	12,4	2,1	30 ± 3,7	95,5	6
3 β-methoxy-5-androsten-17 β-ol	20,7 ± 1,34	19,8	2,4	65 ± 4,2	13,2	6
Above + Cortisone . . .	14,6 ± 1,40	10,3	1,3	23 ± 6,2	17,1	6
Ethinyltestosterone (Pregneninolone) . . .	24,5 ± 1,64	23,0	2,9	58 ± 2,2	32,8	6
Above + Cortisone . . .	12,7 ± 1,19	8,4	1,2	22 ± 4,1	55,3	5
Series III						
Controls — untreated . .	26,1 ± 0,96	25,3	2,7	57 ± 3,7	10,6	6
Cortisone	12,4 ± 1,03	9,1	0,9	24 ± 3,9	12,7	6
Pregnenolone	25,0 ± 2,42	23,3	3,0	58 ± 5,4	10,8	6
Above + Cortisone . . .	12,3 ± 0,78	8,9	1,1	25 ± 1,7	14,8	6
3 β-methoxy-5-pregnen-20-one	23,8 ± 0,98	22,3	2,6	60 ± 2,7	11,1	6
Above + Cortisone . . .	14,4 ± 1,65	10,6	1,5	23 ± 5,2	12,7	6
Series IV — Estrogenic Substances						
*Controls — untreated . .	22,2 ± 0,83	21,5	2,8	63 ± 5,0	12,6	6
**Controls — untreated .	26,1 ± 0,96	25,3	2,7	57 ± 3,7	10,6	6
*Cortisone	14,2 ± 1,98	10,6	0,7	17 ± 1,9	13,3	6
**Cortisone	12,4 ± 1,03	9,1	0,9	24 ± 3,9	12,7	6
*β-estradiol, 100 γ/day . .	23,0 ± 1,38	19,5	3,2	44 ± 3,2	26,3	6
*Above — Cortisone . . .	19,6 ± 2,09	11,9	1,3	9 ± 2,4	33,7	6
*α-estradiol, 100 γ/day . .	24,2 ± 0,81	22,8	3,3	52 ± 3,8	16,0	6
*Above + Cortisone . . .	15,1 ± 2,40	9,6	1,5	8 ± 4,0	15,9	6

Groups marked * were observed simultaneously at one time and those marked ** at another.

Table 2 (Continued).

Treatment	Adrenal Weight mg/100 gm.	Adrenal Weight mg.	Index of Sudanophilia	% Weight Gain	Seminal Vesicle mg/100 gm.	No. Rats
*Diethylstilbestrol, 100 γ/day	25,4 $\pm$ 1,46	19,6	2,8	26 $\pm$ 3,4	27,9	6
*Above + Cortisone . . .	20,1 $\pm$ 0,77	12,0	0,8	0,5$\pm$0,9	34,7	6
**Estradiol benzoate[1], 10 γ/day	24,0 $\pm$ 1,36	21,4	3,2	43 $\pm$ 3,8	29,0	6
**Above + Cortisone . .	15,6 $\pm$ 1,17	11,1	1,4	23 $\pm$ 3,1	35,8	6
**Estradiol benzoate[1] 100 γ/day	25,1 $\pm$ 2,60	20,2	2,8	35 $\pm$ 6,7	32,7	6
**Above + Cortisone . .	18,5 $\pm$ 1,44	12,3	1,3	12 $\pm$ 3,5	38,3	6
**β-Estradiol[1], 10 γ/day .	23,5 $\pm$ 1,55	21,2	3,1	51 $\pm$ 5,1	22,4	6
**Above + Cortisone . .	15,6 $\pm$ 0,99	10,8	1,9	30 $\pm$ 5,2	25,5	6

Groups marked * were observed simultaneously at one time and those marked ** at another.

[1] Given in sesame oil solution.

The statistical value used in this and subsequent tables is the standard error of the mean: S.E. $= \sqrt{\frac{\varepsilon\, d^2}{N\,(N-1)}}$.

dosage. In all cases the adrenal weight of animals receiving combined treatments tended to exceed that of animals receiving cortisone alone when results were expressed either in absolute or relative terms. With the number of animals used the statistical significance of all these differences could not be established.

It is not clear from this data what factors determine the relatively slight and variable effects of estrogens as they were used here in different forms and dosage. The effects of estrogens on the adrenal are probably fundamentally different from those of steroids such as MAD. Unlike the steroids which antagonized cortisone effectively, the estrogens are known generally to increase adrenal weight. We found that they frequently increased the sudanophilic index when given alone. Insofar as they were able to counteract cortisone, it may have been due to the estrogens acting as stress-like agents.

Relative Effectiveness of Active Adrenal-Maintaining Steroids: It is seen from Table 1 that several steroids were of approximately equal effectiveness, when given in 2 mg. daily doses, in preventing adrenal atrophy in animals treated with cortisone. We then gave five of the most active of these compounds at doses of 0.25 mg. daily to determine if this smaller dose would reveal whether some of them were actually more potent than others (Table 3). The results show clearly that MAD and dihydrotestosterone were of about equal activity as judged by their effects on adrenal weight. Further dose reduction, however, would likely

reveal a difference between these two compounds because at the dosage of 0.25 mg. MAD maintained the sudan-staining lipids of the adrenal better than dihydrotestosterone. On this basis MAD is considered to be the most active steroid tested. The other compounds shown in Table 3 were inferior to MAD by all criteria observed.

Table 3. *The unequal effect on Adrenal weight and Sudanophilia of low doses (0,25 mg/day) of compounds equally active at high dosage (2,0 mg/day).*

Treament	Adrenal Weight		Index of Sudanophilia	% Weight Gain	Seminal Vesicle mg/100 gm.	No. Rats
	mg/100 gm.	mg.				
Controls — untreated . .	24,0 ± 1,22	23,2	2,9	67 ± 3,1	14	10
Cortisone alone	12,5 ± 0,61	8,7	0,3	19 ± 2,2	14	10
Cortisone + the following:						
17 α-methyl-5-androstene-3 β, 17 β-diol (MAD) . .	20,5 ± 0,90	15,0	2,4	19 ± 1,8	64	10
17 β-hydroxyandrostan-3-one(Dihydrotestosterone)	19,8 ± 0,94	14,8	1,4	25 ± 2,3	152	10
17 α-methyltestosterone .	16,5 ± 0,79	11,8	1,0	20 ± 2,2	82	10
Testosterone Propionate .	15,0 ± 0,81	11,5	—	22 ± 2,3	181	12
17 β-methoxy-4-androsten-3-one	12,9 ± 0,56	9,1	0,8	18 ± 1,5	26	10

At the 0,25 mg. dosage none of these steroids antagonized the body weight-depressing effects of cortisone as well as they had in previous experiments at higher dosage[3].

Effects of 60-day Periods of Treatment: In this and in our previous work cortisone and other steroids were given for either 7 or 20 days and in all cases to animals approximating 60 grams in body weight.

Table 4. *Effect on Adrenal weight of Methylandrostenediol given for 60 days to cortisone-treated rats.*

(Daily Dosage: Cortisone acetate, 1 mg/day; MAD, 2 mg/day.)

Treatment	Adrenal Weight		% Weight Gain	Seminal Vesicle mg/100 gm.	No. Rats
	mg/100 gm.	mg.			
Controls — untreated . .	12,3 ± 0,33	43,6	195 ± 15	239	15
Cortisone only	10,2 ± 0,27	30,4	133 ± 13	276	15
Cortisone + 17 α-methyl-5-androstene-3 β, 17 β-diol	14,4 ± 0,53	38,9	114 ± 11	403	12

It was of interest, therefore, to find if the same doses of MAD would antagonize the adrenal-depressing effects of cortisone when given over a 60-day period to larger animals (initial weight, approximately 130 grams; terminal weight, approximately 300 grams). The results are shown in

Table 4. The differences in adrenal size between the various groups were less striking than those seen in younger animals but they were of the same nature, i. e., both absolute and relative adrenal weight was higher after treatment with MAD plus cortisone than in those receiving cortisone alone. The fact that MAD was apparently less effective in the long-term than in the short-term experiments may have been due (a) either to an acquired refractoriness to the cortisone, MAD or both or (b) because the dosage was not adequate for maximal effects when the rats acquired large size.

Discussion.

On the basis of the data presented some conclusions can be drawn concerning the relation between chemical structure of the steroid molecule and its ability to prevent cortisone inhibition of the adrenal. If we are correct in the conclusion that MAD is the most effective compound observed, then other molecules with lesser or no adrenal-maintaining activity can be compared with it.

Of greatest importance for activity is the presence of functional groups at carbon atom 17 in the steroid molecule. If no functional groups are attached to C-17, as in 4-androsten-3-one, no adrenal-maintaining activity is observed. A high order of activity is evident if the position is occupied by a β-OH group, an activity which, if anything, is enhanced by the presence in addition of an α-methyl group. The one compound studied with a ketone group at C-17 — dehydroisoandrosterone, was only weakly active. Using the methyl ether of the 17-β — alcohol, as in 17 β-methoxy-4-androsten-3-one, reduced activity when the testing was done at a low-dose level (Table 3). If, however, more than one carbon is attached to carbon 17, either as in the ethyl-, vinyl- or ethinyl-derivatives of androstane or androstene or as in any of the pregnene derivatives, their activity is either sharply curtailed or abolished.

Variations in the steroid molecule at C-3 may limit but will not abolish activity. In the absence of a functional group at C-3, as in 17 α-methyl-17 β-androstanol, some but weak activity is evident. The substitution of a methoxy for a hydroxyl group at C-3 weakens adrenal-maintaining activity slightly. This is seen if one compares with appropriate controls the actions of the following compounds: 5-androstene-3β, 17 β-diol (Table 1) vs. 3 β-methoxy-5-androsten-17 β-ol (Table 2, Series II); dehydroisoandrosterone (Table 1) vs. 3 β-methoxy-5-androsten-17-one (Table 1) and 17 α-methyl-5-androstene-3 β, 17 β-diol (Table 1) vs. 3 β-methoxy-17 α-methyl-5-androsten-17 β-ol (Table 2, Series II).

If one can judge by the apparent superiority of MAD, it might be inferred that the most efficient structure is exemplified by the presence of a β-hydroxyl group at C-3 with a double bond at 5—6. Actually it is

apparent only that variations at these positions result in quantitative alterations in potency and that several deviations from the structure present in MAD support strong adrenal-maintaining activity.

The estradiol molecule, as indicated above, has only weak activity. It may antagonize the effect of cortisone, if it does so at all, by acting like a stressing agent thus tending to cause ACTH release. The estrogens differ from most of the other adrenal-maintaining steroids discussed here in that they are adrenal stimulants when given alone.

As pointed out previously[3] no clear-cut correlations can be made between the ability to prevent cortisone atrophy of the adrenal and other biological properties of the steroids concerned. It is true that all of the more potent cortisone antagonists are androgenic but their adrenal effects are not proportional to their androgenicity. The most potent compound in adrenal maintenance, MAD, is a weak androgen. Some androgens (e. g. vinyltestosterone) fail completely to prevent adrenal atrophy during cortisone treatment.

A question of paramount interest concerns the functional capacity of the adrenal maintained with other steroids in the presence of treatment with cortisone. It is hardly conceivable that the large lipid-laden adrenal of the animal given MAD plus cortisone is not more active in some respect than is the shrunken adrenal of the cortisone-treated animals. Although the question is still unsettled, a considerable amount of effort in this and other laboratories has failed thus far to demonstrate such a difference. It is clear both in cortisone-treated and in hypophysectomized[3, 9] animals that steroids such as MAD can substitute in part for ACTH in maintaining adrenal structure; that they can substitute for ACTH in maintaining adrenal function remains to be demonstrated.

Zusammenfassung.

1. Die Verhütung der durch Cortison-Behandlung verursachten Nebennieren-Atrophie mittels gewisser Steroid-Verbindungen wurde erneut untersucht und durch Verwendung vormals noch nicht untersuchter Substanzen erweitert.

2. Die Nebennieren-hemmende Wirkung des Cortisons wird durch Steroid-Verbindungen mit 21 Kohlenstoffatomen schwach oder gar nicht antagonistisch beeinflußt, während viele Steroide mit 19 und 20 C-Atomen diese antagonistische Wirkung in ausgesprochenem Maße besitzen. Dieser Antagonismus scheint stark von der Konfiguration am Kohlenstoffatom 17 und zum geringeren Grade am Kohlenstoffatom 3 des Steroidmoleküls abzuhängen. Es ist zur Zeit noch nicht möglich die Art der Konfiguration genau zu definieren, aber die wirksamste Struktur wurde im 17-Methylandrostendiol gefunden, wenn die Erhaltung des Gewichts und die Lipoid-Verteilung in der Nebenniere der Cortison-

behandelten Tiere als Kriterien und die Wirksamkeit mit niedrigster Dosis als Bedingung herangezogen wurde. Dihydrotestosteron, Methyltestosteron und Testosteropropionat waren fast ebenso wirksam wie Methylandrostendiol.

3. Die Nebennieren hemmende Cortison-Wirkung kann bis zu einem gewissen Grade für 60 Tage antagonistisch beeinflußt werden.

4. Die stärker wirksamen Steroide sind alle entweder starke oder mäßig starke Androgene. Die Intensität des Cortison-Antagonismus läuft jedoch in keiner Weise der Stärke der androgenen Eigenschaft parallel. Außerdem sind nicht alle Androgene auch Antagonisten im besprochenen Sinn.

5. Berechnet man die experimentell erhaltenen Nebennierengewichte bezogen auf das Körpergewicht, so kommt man zu dem Resultat, daß auch die Oestrogene zu einem gewissen Grad die Nebennieren-Cortison-Atrophie verhüten können, jedoch ist die Erhaltung des absoluten Nebennierengewichts oder einer normalen Lipoid-Verteilung in den Cortison-behandelten Tieren unregelmäßig. Wahrscheinlich handelt es sich hier um einen anders gearteten Wirkungsmechanismus, der sich grundsätzlich von demjenigen anderer Steroide, wie z. B. Methylandrostendiol, unterscheiden dürfte.

Acknowledgments.

The authors are indebted to the Chemical Research Division of this laboratory, and in particular to Dr. Arthur St. Andre, for supplying the steroids used in these studies.

Bibliography.

[1] Cutuly, E., E.C. Cutuly and R. D. McCullagh: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **38**, 818 (1938). — [2] Gaunt, R., C. Howell and N. Antonchak: J. Clin. Endocrin., Springfield **12**, 958 (1952). — [3] Gaunt, R., C. Howell, N. Antonchak and J. H. Leathem: Endocrinology (in press.). — [4] Leathem, J. H., and B. J. Brent: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **52**, 341 (1943). — [5] Leathem, J. H.: Anat. Rec. **89**, 155 (1944). — [6] Leonard, S. L.: Endocrinology **35**, 83 (1944). — [7] Selye, H., and Helen Stone: On the Experimental Morphology of the Adrenal Cortex. American Lecture Series No. 74. Springfield, Ill.: Charles C. Thomas 1950. — [8] Winter, Charles, A., and Helen L. Hollings: J. of Pharmacol. **103**, 366 (1951). — [9] Winter, C. A., H. L. Hollings and R. B. Stebbins: Endocrinology **52**, 123 (1953). — [10] Zizine, L. A., M. E. Simpson and H. E. Evans: Endocrinology **47**, 97 (1950). — [11] Zizine, L.: C. r. Soc. biol. Paris **146**, 910 (1952).

Dr. Robert Gaunt, Director of Endocrine Research, Ciba Pharmaceutical Products, Inc. Summit, N. Y.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 100—110 (1953).

Department of Pharmacology, New York University College of Medicine, New York City.

Prolactin as an Insulin Antagonist*.

By

M. W. Sinkoff and R. C. Bodo**.

With 4 figures in the text.

(Eingegangen am 24. Februar 1953.)

It has been established that animals deprived of either their adrenal or pituitary glands manifest a hypersensitivity to the hypoglycemic action of insulin. However, it has been demonstrated that the adrenalectomized dog is far less sensitive to insulin than the hypophysectomized dog[11, 12]. More recently, this work was extended to show that the insulin sensitivity of the adrenalectomized-hypophysectomized dog is far greater than that of the adrenalectomized dog and even than that of the hypophysectomized dog[10]. Since the hypophysectomized or adrenalectomized-hypophysectomized dog lacks all the anterior pituitary hormones whereas the adrenalectomized dog possesses them (although its adrenocorticotrophic hormone [ACTH] is inoperative)***, these differences in insulin response suggest the importance of certain anterior pituitary hormones other than ACTH in carbohydrate metabolism.

A great amount of evidence has been presented which shows that administered growth hormone exerts potent actions on the carbohydrate metabolism of normal[14, 15, 19], subtotally depancreatized[17] and hypophysectomized[3, 4, 5] animals. Among the other anterior pituitary hormones, the effect of the gonadotrophins in carbohydrate metabolism, if any, is negligible[25] and can be dismissed. Thyrotrophin appears to play only a minor role[25] which is secondary to its general metabolic effect. The search for anterior pituitary hormones which affect carbohydrate metabolism, therefore, led to an investigation of the actions of prolactin.

The present report is concerned with the effects of prolactin upon the insulin hypersensitivity and abnormal glucose tolerance of hypophysectomized and adrenalectomized-hypophysectomized dogs. These

* Aided by grants from the National Institutes of Health, United States Public Health Service, from the American Cancer Society (recommended by the Committee on Growth of the National Research Council), and from the Eli Lilly and Company.

** In honor of Prof. O. Loewi on his 80th birthday.

*** Prolonged administration of ACTH to adrenalectomized dogs produced no change in their insulin hypersensitivity.

results are then compared with the effects obtained previously with growth hormone regimens of similar dosages and duration[3]. It was hoped that a better understanding would be achieved concerning the influence that the anterior pituitary gland exerts on carbohydrate metabolism (exclusive of its secretion of ACTH) and with special reference to the nature of the insulin antagonists elaborated by this endocrine gland.

Methods.

Trained, unanesthetized male and female hypophysectomized and adrenalectomized-hypophysectomized dogs were used. All dogs in both groups had had their hypophyses removed 143 to 271 days prior to hormone administration, and manifested a maximal hypersensitivity to insulin (60 to 100× that of normal dogs[3, 22]) prior to hormone administration. In addition, the adrenal glands of the adrenalectomized-hypophysectomized dogs had been removed 120 to 130 days prior to the prolactin regimens. The technique of hypophysectomy*[2] and the postoperative care*[2] have been described. The adrenalectomized-hypophysectomized dogs were prepared by either of 2 three-stage procedures: 1. a normal dog underwent two-stage adrenalectomy and final hypophysectomy, or 2. a hemi-adrenalectomized dog subsequently underwent hypophysectomy and then final hemi-adrenalectomy. These latter dogs were maintained in good condition with minimal doses (1.5 to 2.0 mg. daily) of desoxycorticosterone acetate (DCA) in oil (Schering)* administered intramuscularly. All dogs (both hypophysectomized and adrenalectomized-hypophysectomized) were fed a mixed diet[3]. Experiments were performed in the morning in the postabsorptive state, i. e., 17 to 18 hours after the last food intake. Sensitivity to the hypoglycemic action of insulin was tested by following the 4-hour blood sugar changes after the intravenous administration of insulin (Lilly)*, 0.025 U/kg. ("the test dose"). The glucose tolerance was determined by the 4-hour blood sugar changes following an intravenous infusion of glucose (0.075 g/kg/min.) for 10 min. Blood sugar was determined by the Hagedorn-Jensen method[16] using 1 ml. of blood and the Somogyi acid-zinc filtrate[23].

The prolactin preparations used were Squibb lots Nr. 71713 and 71713 H, and were kindly supplied by Dr. R. W. Bates, formerly of E. R. Squibb and Sons. Prolactin lot Nr. 71713 had a potency of 20—25 IU/mg., and assay showed that it contained at most 0.02 unit ACTH/mg. according to the assay method of Sayers[21]. Assay for growth hormone revealed no signs of growth activity in hypophysectomized rats even in dosages of 1—5 mg. daily. Growth hormone preparations produced appreciable growth in similar hypophysectomized rats in dosages of 0.02—0.05 mg/day. Thus prolactin Nr. 71713 certainly had less than 5 per cent growth hormone[1]. Prolactin Nr. 71713 H was the preparation obtained after Nr. 71713 had been heated in order to destroy whatever negligible growth hormone contamination might have been originally present. Its potency was described as being approximately 20 per cent of that of Nr. 71713, i. e., 4—5 IU/mg. The preparations were administered in dosages of 1—5 mg/kg. intramuscularly once daily, usually after the afternoon feeding, for a period of 19—30 days. In certain experiments, the first injection of prolactin was administered intravenously in dosages of 0.75 mg/kg. in the postabsorptive state, and the blood sugar subsequently followed for 4 hours.

* We should like to express our appreciation to: Dr. R. K. Richards of Abbott Laboratories for Pentothal Sodium, Nembutal, and Penicillin G Procaine Aqueous; Dr. A. C. Bratton, jr., of Parke, Davis and Company for Thrombin Topical and Penicillin S-R; Dr. E. Henderson of Schering Corporation for Cortate; and Dr. K. K. Chen of Eli Lilly and Company for Insulin and Duracillin.

Results.

I. Studies in Hypophysectomized Dogs.

A. Effects of the First Dose of Prolactin. When the first dose of prolactin (0.75 mg/kg.) was administered intravenously in the post-absorptive state, no fall at all in blood sugar was observed in any dog (Table 1, dog Nr. 98). This result was in marked contrast to the previously described hypoglycemic action of growth hormone[18]. The hypoglycemic action of growth hormone is demonstrated by the intravenous administration of the first injection of the hormone in the post-absorptive state. This is then followed by a prolonged fall in the blood sugar of the hypophysectomized dog (Table 1, dog Nr. 98) with a subsequent slow recovery to the post-absorptive level.

Table 1. *Effect of the first dose of Prolactin (Pro) on the blood sugar of hypophysectomized (Hyphex) dog Nr. 98 when administered intravenously in the postabsorptive state, compared with that of either intravenous Insulin (Ins) or intravenous growth Hormone (GH).*

Time in min.	Hyphex Dog Nr. 98		
	Blood Sugar in mg.%		
0	61	60	65
	Ins[1]	GH[2]	Pro[3]
10	54	53	67
20	44	35	66
30	35	35	73
40	32	32	69
50	31	32	69
60	29	36	68
75	31	33	67
90	34	34	66
120	41	36	66
150	48	34	62
180	52	35	62
210	54	34	62
240	61	34	60

[1] Insulin, 0.025 u/kg. i. v., at 0 time.
[2] Growth Hormone, 0.5 mg/kg. i. v., at 0 time.
[3] Prolactin, 0.75 mg/kg. i. v., at 0 time.

B. Effects of Prolactin Regimens. In all the hypophysectomized dogs continued administration of prolactin exerted a definite anti-insulin action, i.e., 1. the marked blood sugar fall observed in the untreated hypophysectomized state following the injection of insulin was diminished considerably, and 2. the recovery of the blood sugar towards post-absorptive levels was greatly accelerated when compared with the

rate of recovery in the untreated state after insulin (Fig. 1, dog Nr. 85). The dosages (1 mg/kg/day i.m.) were similar to those used in studies previously reported from this laboratory in which the marked anti-insulin and diabetogenic actions of growth hormone were demonstrated in hypophysectomized dogs[3]. However, in these experiments it was shown that as few as 2—4 doses of growth hormone, 1 mg/kg/day i.m.,

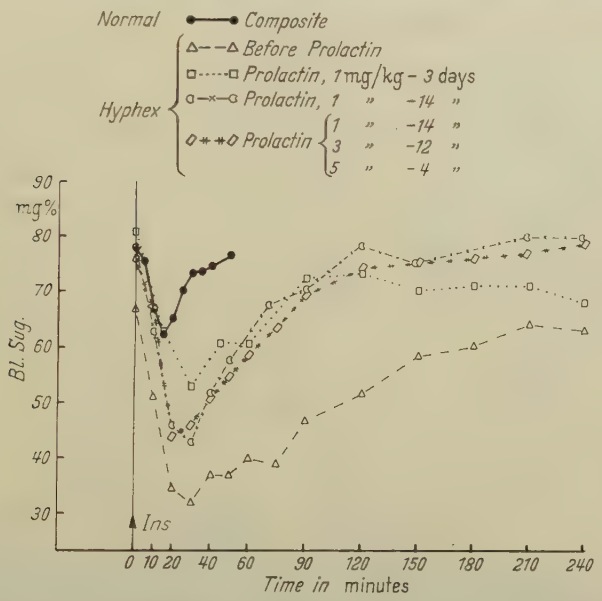


Fig. 1. Blood sugar curves produced by insulin (0.025 u/kg. i.v.) in hypophysectomized (hyphex) dog Nr. 85 before and during a prolactin regimen. Squibb prolactin Nr. 71713, 1—5 mg/kg/day, administered. Insulin tests performed after 3, 14, and 30 days of the prolactin regimen.

were sufficient not only to abolish the insulin hypersensitivity of maximally sensitive hypophysectomized dogs (Fig. 2, dog Nr. Hy 7) but also to produce a resistance to large doses of insulin[3]. Thus prolactin did not reduce the exaggerated insulin response of any of the hypophysectomized dogs to the same degree as had growth hormone with similar dosages and shorter durations of administration.

According to its assay, prolactin preparation Nr. 71713 containd about 2 per cent ACTH as a contaminant. Previous work had shown that prolonged administration of ACTH to hypophysectomized dogs could abolish their insulin hypersensitivity and thus restore their exaggerated insulin responses to normal[6, 7, 13]. Although the amounts of ACTH present in the prolactin did not appear to be sufficient to produce such effects (as will be discussed later), it was considered essential to rule out experimentally any possible action of the ACTH contaminant.

II. Effects in Adrenalectomized-Hypophysectomized Dogs.

A. Elimination of the Effect of the ACTH Contaminant. When administered again in dosages of 1 mg/kg/day i.m., prolactin greatly diminished the insulin hypersensitivity of the adrenalectomized-hypophysectomized dogs. This was seen in the earliest experiments after only 4 doses (Table 2, dogs Nr. K—75 and Nr. K=77). With continued admi-

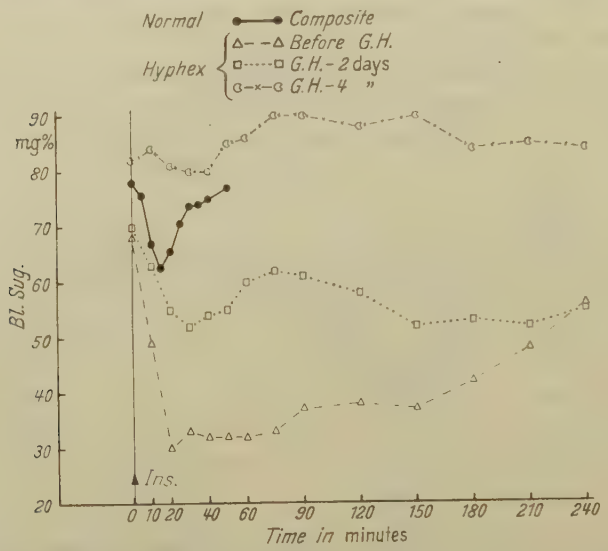


Fig. 2. Blood sugar curves produced by insulin (0.025 u/kg. i.v.) in hypophysectomized (hyphex) dog Nr. Hy=7 before and during a growth hormone (G. H.) regimen. Armour growth hormone Nr. 22KRl, 1 mg/kg/day, administered. Insulin tests performed after 2 and 4 days of the growth hormone regimen.

nistration and increases in dosage to 3 mg/kg/day, there was almost complete abolition of the abnormal insulin response of some dogs., i.e., the response had been restored practically to normal (Table 2, dogs Nr. K=75 and Nr. K=77). However, in other dogs, the initial response obtained after 4 doses of prolactin apparently did not increase either with prolongation of administration and/or increase in dosage to 3 mg/kg/day. In most dogs, there were elevations of the postabsorptive blood sugar above normal levels (Table 2, dog Nr. K—77). Once again, as in the studies with hypophysectomized dogs, the effects of intramuscularly administered prolactin were less than those reported with growth hormone regimens.

Similarly, prolactin administration reduced the secondary hypoglycemia seen in the glucose tolerance tests of these animals (Fig. 3, dog Nr. K=75). Again, varied effects were produced. In several animals there was abolition of the secondary hypoglycemia without any other

Table 2. *Insulin sensitivity in normal and adrenalectomized-hypophysectomized (Adrex-Hyphex) dogs Nr. K-75 and Nr. K-77 before and during Prolactin regimens.*

A. Dog Nr. K=75						B. Dog Nr. K=77					
Time in min.	Normal Composite[1]	Adrex-Hyphex Dog Nr. K=75				Time in min.	Normal Composite[1]	Adrex-Hyphex Dog Nr. K=77			
	Doses of Prolactin[2]						Doses of Prolactin[2]				
	0	0	4[3]	9[3]	19[4]		0	0	4[3]	11[3]	19[4]
	Blood Sugar in mg. %						Blood Sugar in mg. %				
0	78	53	70	64	80	0	78	66	75	87	88
Insulin 0.025 u/kg. intrav. at 0 time						Insulin 0.025 u/kg. intrav. at 0 time					
10	67	32	54	52	66	10	67	42	55	79	78
20	66	29	47	47	60	20	66	29	42	65	67
30	74	31	54	49	67	30	74	34	48	60	64
40	75	31	58	57	69	40	75	35	51	60	64
50	77	28	60	57	72	50	77	36	55	65	67
60		26	64	57	72	60		39	62	65	68
75		28	65	61	72	75		43	59	66	76
90		28	65	60	72	90		46	60	—	81
120		36	65	60	72	120		50	64	79	85
150		45	65	60	71	150		54	67	85	88
180		58	68	61		180		57	75	83	
210		56	69	61		210		61	77	84	
240		56	71	61		240		62	78	84	

[1] Based on 37 insulin sensitivity tests on 18 normal dogs.
[2] Prolactin used was Squibb preparation Nr. 71713.
[3] Dosage of prolactin: 1.0 mg/kg/day intramuscularly once daily.
[4] Dosage of prolactin: 1.0 mg/kg/day intramuscularly once daily for 13 days; 3.0 mg/kg/day intramuscularly once daily for 6 more days.

changes, the glucose tolerance thus approximating that of normal dogs. However, in a few animals 1. the peak of the blood sugar, obtained immediately at the termination of the 10-minute intravenous glucose infusion, was greatly elevated over both the normal and the untreated values, and 2. the decline in the blood sugar occurred at a rate slower than that seen in either normal dogs or during the untreated state. This questionable tendency towards diabetes induced by prolactin when administered for as long as 30 days did not approach in any way the severe diabetes mellitus which can be produced by growth hormone, 1 mg/kg/day, in as short a time as 3 days (Fig. 4, dog Nr. Hy = 7)[3].

B. Elimination of the Effect of the Growth Hormone Contaminant. Prolactin preparation Nr. 71713H was administered in dosages of 1—4 mg/kg/day i.m. to adrenalectomized-hypophysectomized dogs. A diminution

of the insulin hypersensitivity of these animals was produced without the appearance of a diabetic glucose tolerance even after 16 days administration. The effects upon the insulin response of a typical adrenalectomized-hypophysectomized dog Nr. K=77, are represented in Table 3.

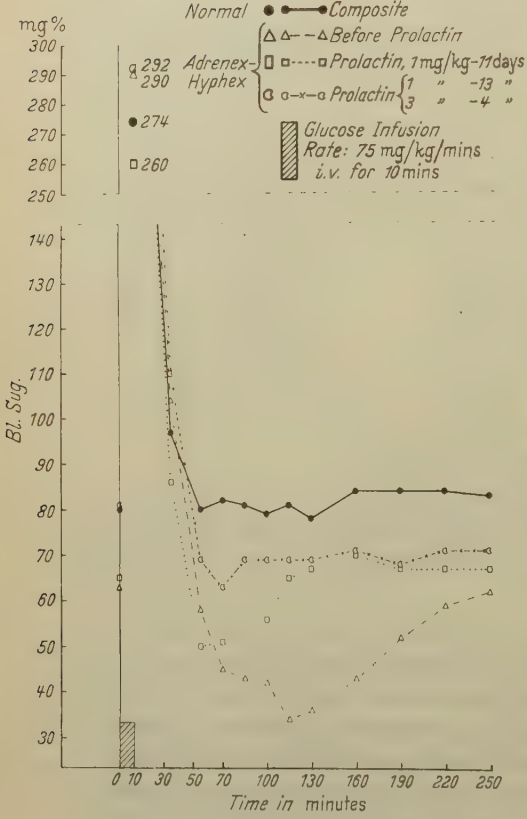


Fig. 3.

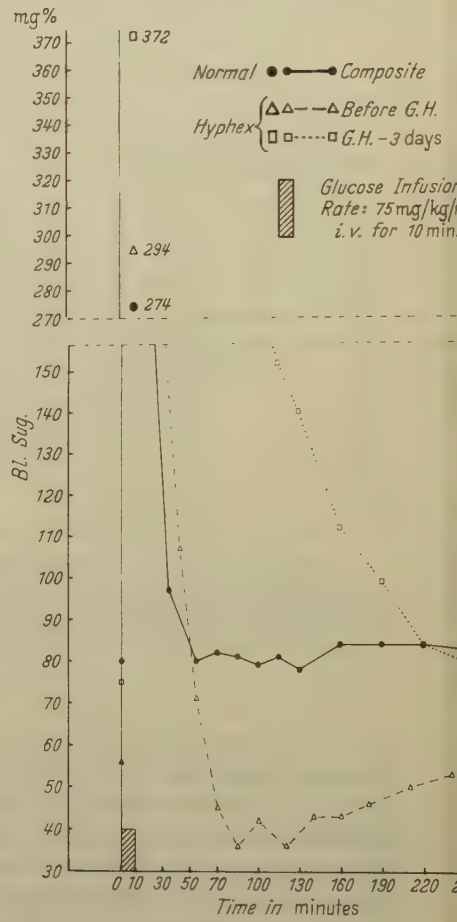


Fig. 4.

Fig. 3. Blood sugar curves produced by intravenous glucose (0.75 gm/kg.) in adrenalectomized-hypophysectomized (adrenex-hyphex) dog Nr. K=75 before and during a prolactin regimen. Squibb prolactin Nr. 71713, 1—3 mg/kg/day, administered. Glucose tolerance tests performed after 11 and 17 days of the prolactin regimen.

Fig. 4. Blood sugar curves produced by intravenous glucose (0.75 gm/kg.) in hypophysectomized (hyphex) dog Nr. Hy=7 before and during growth hormone regimen. Armour growth hormone Nr. 22KRl, 1 mg/kg/day, administered. Glucose tolerance test performed after 3 days of the growth hormone regimen.

Table 3. *Insulin sensitivity of normal dogs and of adrenalectomized-hypophysectomized (Adrex-Hyphex) dog Nr. K-77 before and during administration of a heated prolactin preparation, Squibb lot Nr. 71713 H.*

Time in min.	Normal Composite[1]	Adrex-Hyphex Dog Nr. K=77		
	Doses of Prolactin			
	0	0	5[2]	16[3]
	Blood Sugar in mg.%			
0	78	62	66	70
	Insulin 0.025 u/kg. intrav. at 0 time			
10	67	43	54	54
20	66	34	35	45
30	74	25	31	47
40	75	25	31	51
50	77	23[4]	33	53
60			37	54
75			37	58
90			44	59
120			51	64
150			56	70
180			58	69
210			60	69
240			62	

[1] Based on 37 insulin sensitivity tests on 18 normal dogs.

[2] Dosage of prolactin: 1.0 mg/kg/day intramuscularly once daily.

[3] Dosage of prolactin: 1.0 mg/kg/day intramuscularly once daily for 6 days; then 4.0 mg/kg/day intramuscularly once daily for 10 more days.

[4] Hypoglycemic convulsions.

Discussion.

Continued administration of prolactin, in dosages of 1 mg/kg/day i.m., exerted a significant anti-insulin action in both hypophysectomized and adrenalectomized-hypophysectomized dogs, i.e., it greatly diminished or completely abolished the exaggerated response to insulin and the secondary hypoglycemia of the glucose tolerance test. When first given to hypophysectomized dogs, the prolactin effects were questioned as possibly being due to its ACTH contamination (considered to be at most 2% by the SAYERS method)[21]. However, even if it were assumed that the preparation contained 2 per cent ACTH, i.e., 0.02 mg/kg/day ACTH was being administered, it was thought highly unlikely that the anti-insulin action obtained in these dogs could be attributed solely to such small amounts of ACTH. Previous work had shown that prolonged administration of very potent ACTH preparations was required in order to abolish the insulin hypersensitivity of hypophysectomized dogs[6, 7, 13].

Nevertheless, the problem of ACTH contamination was clearly eliminated by the use of adrenalectomized-hypophysectomized dogs. In these dogs, too, prolactin exerted marked anti-insulin effects.

It was still necessary to rule out the possible influence of the growth hormone content of the prolactin preparations on the effects attributed to the prolactin, although on assay it was shown that the growth hormone content, if any, of preparation Nr. 71713 was negligible. By the use of the heated prolactin preparation, Nr. 71713H, and the demonstration that even this greatly attenuated preparation could diminish the insulin hypersensitivity of adrenalectomized-hypophysectomized dogs, any possible implication of growth hormone as the active agent in the original prolactin preparation Nr. 71713 was effectively eliminated. In view of these findings, it can be stated that prolactin has an anti-insulin action independent of either ACTH or growth hormone.

In a comparison of the effects on carbohydrate metabolism produced by prolactin or by growth hormone certain points of difference were noted. One, prolactin, when administered intravenously for the first time to the hypophysectomized dog in the post-absorptive state, produced no hypoglycemia whatsoever, as had been observed with growth hormone. Two, the anti-insulin action of prolactin was not so marked as that of growth hormone with similar dosages and durations of administration, nor did prolactin produce any appreciable evidence for diabetes even when administered in dosages of 1—5 mg/kg/day for as long as 30 days. It had been established previously that growth hormone, 1 mg/kg/day, can completely abolish the insulin hypersensitivity of hypophysectomized dogs after 4—5 doses and produce diabetes mellitus after 3—8 doses[3]. In addition to these differences in carbohydrate metabolism, another difference was observed during these studies, viz., prolactin did not raise the levels of the daily water exchange of the treated dogs; growth hormone has been shown to induce a polyuria similar to that observed in surgically-induced diabetes insipidus[8, 9].

From the above observations, then, it appears that while prolactin is similar to growth hormone in that it, too, is an insulin antagonist, it is, nevertheless, much less effective than growth hormone. Moreover, prolactin differs from growth hormone since it lacks any hypoglycemic activity and does not raise the levels of the daily water exchange to those seen in surgically-induced diabetes insipidus. Growth hormone exerts its anti-insulin action by virtue of its ability to decrease the peripheral utilization of sugar[20, 24]. At present, there is no experimental evidence available which can suggest a possible mode of action for the prolactin effects in carbohydrate metabolism.

It is apparent, therefore, that of the anterior pituitary hormones thus far isolated, more than one can antagonize the hypoglycemic action

of insulin. This suggests the following: 1. both growth hormone and prolactin as individual hormones of the anterior pituitary gland can exert an anti-insulin action which is an intrinsic property of these hormones; 2. there is a separate "anti-insulin" or "diabetogenic" factor which is an independent hormone of the anterior pituitary gland. This factor is fragmented during the various processes used in the purification of the adenohypophyseal hormones, so that the greater part may be linked with growth hormone (thereby accounting for its more potent action), and the other with prolactin. Furthermore, this "anti-insulin" or "diabetogenic" factor is independent of whatever factor(s) may be responsible for growth hormone's hypoglycemic and diabetes insipidus-like actions, both of which are not produced by prolactin.

Summary and Conclusions.

1. Prolactin in dosages of 1—5 mg/kg/day produced an anti-insulin action in hypophysectomized dogs, i.e., it diminished the exaggerated insulin response of these animals. It concomitantly diminished the secondary hypoglycemia of the glucose tolerance test without producing diabetes mellitus. These actions were not so marked as those of growth hormone in comparable dosages.

2. These actions were not due to the ACTH content of the preparations, since prolactin in dosages of 1—3 mg/kg/day exerted similar actions in adrenalectomized-hypophysectomized dogs.

3. These actions likewise were not due to the growth hormone content of the preparations, since the same prolactin preparation, after heating had destroyed all growth activity, still diminished the insulin hypersensitivity and secondary hypoglycemia of the glucose tolerance of adrenalectomized-hypophysectomized dogs.

4. Unlike growth hormone, prolactin does not produce an hypoglycemia when given intravenously for the first time in the post-absorptive state.

5. It is suggested that the anti-insulin action of either prolactin or growth hormone a) is an intrinsic property of the hormone or b) is due to the action of another independent hormone of the anterior pituitary, viz., the "anti-insulin" or "diabetogenic" factor, parts of which are mixed with the prolactin and growth hormone preparations presently available.

Acknowledgment.

We wish to express our appreciation to Mrs. S. P. Kiang and Miss H. Den for their invaluable assistance in this work.

References.

[1] Bates, R. W.: Personal communication. — [2] de Bodo, R. C., H. I. Bloch and I. H. Gross: Amer. J. Physiol. **137**, 124 (1942). — [3] de Bodo, R. C., M. Kurtz, A. Ancowitz and S. P. Kiang: Amer. J. Physiol. **163**, 310 (1950). — [4] de Bodo, R. C., M. Kurtz, A. Ancowitz and S. P. Kiang: Fed. Proc. (Wash.) **9**, 30 (1950). — [5] de Bodo, R. C., M. Kurtz, A. Ancowitz and S. P. Kiang: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **74**, 524 (1950). — [6] de Bodo, R. C., M. Kurtz, N. Lane and S. P. Kiang: Fed. Proc. (Wash.) **11**, 31 (1952). — [7] de Bodo, R. C., M. Kurtz, M. W. Sinkoff and S. P. Kiang: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **80**, 345 (1952). — [8] de Bodo, R. C., I. L. Schwartz, J. Greenberg, M. Kurtz, D. P. Earle jr. and S. J. Farber: Fed. Proc. (Wash.) **10**, 33 (1951). — [9] de Bodo, R. C., I. L. Schwartz, J. Greenberg, M. Kurtz, D. P. Earle jr. and S. J. Farber: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **76**, 612 (1951). — [10] de Bodo, R. C., and M. W. Sinkoff: Recent Progr. Hormone Res., N. Y. 1953, vol. 8. In press. — [11] de Bodo, R. C., M. W. Sinkoff and S. P. Kiang: Fed. Proc. (Wash.) **11**, 31 (1952). — [12] de Bodo, R. C., M. W. Sinkoff and S. P. Kiang: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **80**, 350 (1952). — [13] de Bodo, R. C., M. W. Sinkoff, M. Kurtz, N. Lane and S. P. Kiang: Amer. J. Physiol. (In press.). — [14] Campbell, J., I. W. F. Davidson, W. D. Snair and H. P. Lei: Endocrinology **46**, 273 (1950). — [15] Cotes, P. M., E. Reid and F. G. Young: Nature (Lond.) **164**, 209 (1949). — [16] Hagedorn, H. C., and B. N. Jensen: Biochem. Z. **135**, 46 (1923). — [17] Houssay, B. A., and E. Anderson: Endocrinology **45**, 627 (1949). — [18] Kurtz, M., R. C. de Bodo, S. P. Kiang and A. Ancowitz: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **76**, 21 (1951). — [19] Milman, A. E., and J. A. Russell: Endocrinology **47**, 114 (1950). — [20] Park, C. R., and W. H. Daughaday: Fed. Proc. (Wash.) **9**, 212 (1950). — [21] Sayers, M. A., G. Sayers and L. A. Woodbury: Endocrinology **42**, 379 (1948). — [22] Slater, I. H., R. C. de Bodo, H. F. Weisberg and S. P. Kiang: Fed. Proc. (Wash.) **7**, 116 (1948). — [23] Somogyi, M.: J. of Biol. Chem. **86**, 655 (1930). — [24] Stadie, W. C., N. Haugaard, A. G. Hills and J. B. Marsh: Amer. J. Med. Sci. **218**, 275 (1949). — [25] Unpublished observations.

Dr. M. W. Sinkoff, Department of Pharmacology,
New York University, College of Medicine, New York City.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 111—114 (1953).

Department of Pharmacology, University of Virginia Medical School,
Charlottesville Virginia, USA.

The Effect of Cupric Ions on the Absorption Spectrum of Thyroxine*.

By
CHALMERS L. GEMMILL**.

With 2 figures in the text.

(Eingegangen am 17. Februar 1953.)

In previous publications from this laboratory[3, 4, 6] it was concluded that there is a specific complexing of cupric ion with thyroxine. The evidence for this complexing was obtained mainly from a study of the inhibition by thyroxine of the cupric ion oxidation of ascorbic acid. In order to obtain more direct evidence for this complex, a study was made of the ultraviolet spectra of solutions containing copper and thyroxine.

Methods. The DU (BECKMAN) Spectrophotometer was used for the determination of the spectra. The instrument was calibrated by using potassium dichromate as a standard. Good agreement was obtained between absorbancy with this instrument and the values given by the National Bureau of Standards[7]. For the determination of the spectra of thyroxine and copper in the ultraviolet region the following reagents were used: 16.4 mgm. of thyroxine (sodium salt, Bios, m. w. = 799) dissolved in 8.0 ml. of 0.01 N KOH and made up to 100 ml. with water; 0.0008 N KOH; 4.1 mgm. of cupric acetate (+ 1 H_2O, MALLINCKRODT, Anal. Reagent) in 100 ml. water; 0.1 M sodium acetate (+ 3 H_2O, FISHER, Tested Purity Reagent). The exact composition of the various solutions are given in the Table. Cells of 100 mm. length were used in the spectrophotometer because of the dilution of these solutions. The spectra were determined by measuring the absorbancy (A) given directly on the instrument from 250 mμ. to 360 mμ. All determinations were made at room temperature which averaged 27° C. The p_H of the solutions averaged 7.85 as measured with a BECKMAN Model H-2 glass elektrode p_H meter. All solutions remained clear in these concentrations.

Results. The results are shown in Figs. 1 and 2 and a detailed description of the composition of the solutions is given in the table. The spectrum of thyroxine in the ultraviolet is very sensitive to p_H. In Fig. 1 is shown the spectrum of thyroxine in 0.1 N KOH and in 0.1 N HCl. Changing from alkali to acid caused a pronounced shift in the absorption curve both as to height and position. This shift is due to the hydroxyl group in thyroxine for it occurs in the same region as is given for the

* This investigation was supported in part by a research grant from the National Institutes of Health, Public Health Service.

** In honor of Dr. OTTO LOEWI on his 80th birthday.

hydroxyl group in phenol[14], tyrosine and diiodotyrosine[2] In a separate series of experiments this change has been used to measure the dissociation constant of the hydroxyl group in thyroxine and related compounds[5]. The addition of cupric ions causes also a change in the position and shape of the absorption spectrum of thyroxine in this region. As

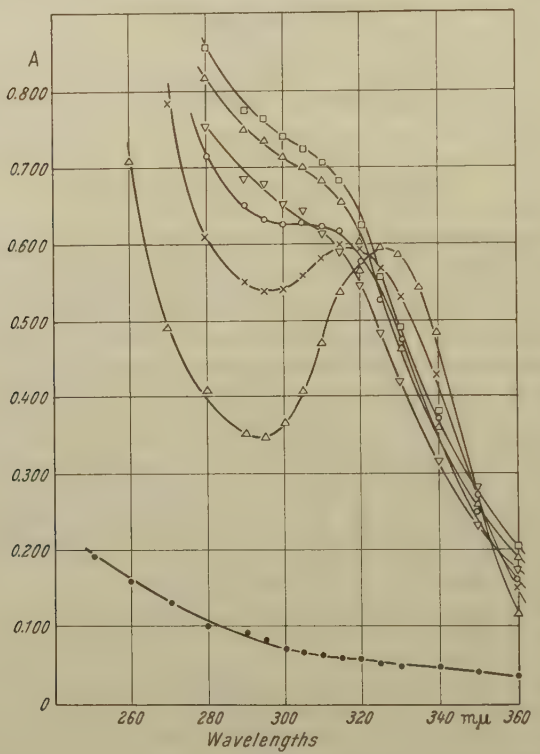


Fig. 1. The Effect of p_H on the Ultraviolet Absorption Spectrum of Thyroxine. — Abscissae, wave lengths in mμ.; ordinates, absorbance. Upper curve, p_H 12.7; lower curve, p_H 1.15. Compositions of solutions; upper curve, 1 ml. of 16.4 mgm. per cent sodium salt of thyroxine (in 100 ml. of 0.0003 N KOH) with 99 ml. of 0.1 N KOH; lower curve, 1 ml. 16.4 mgm. percent sodium salt of thyroxine (in 100 ml. of 0.0003 N KOH) with 99 ml. of 0.1 N HCl. Cells, 100 mm. in length. Final concentration of thyroxine, 2.05×10^{-6} M.

cupric acetate is added in increasing amounts, the curve changes its minimum at 290 mμ. and its maximum at 325 mμ. At a ratio of 5 parts thyroxine to one of copper, the maximum shifts to 315, and at higher concentrations continues to move towards shorter wave lengths with the change reaching a maximum value at a ratio of 5 parts thyroxine to 4 of cupric acetate. Additional increase in cupric acetate causes a slight fall in the absorption curve.

Discussion. It is obvious that a change in molecular species has occurred when thyroxine and cupric acetate are mixed in solution. These changes are entirely different from those described by SPIES[13] for copper complexing with amino acids. He described an absorption maximum at 235 mμ. for the copper salts of various amino acids. Some evidence for such a band may be seen in Fig. 2, for there is a change in the position of the bands with variation in copper at the shorter wave lenghts. However, the band under consideration in the present study has its maximum in an entirely different region, namely, 325 mμ. The most possible explanation of these changes is to assume that copper complexes with thyroxine through its terminal hydroxyl group, thus changing the characteristic spectrum of this group in thyroxine in the ultraviolet region. It is proposed to make an intensive study of this reaction with other metal ions, at various p_H levels and with derivates of thyroxine.

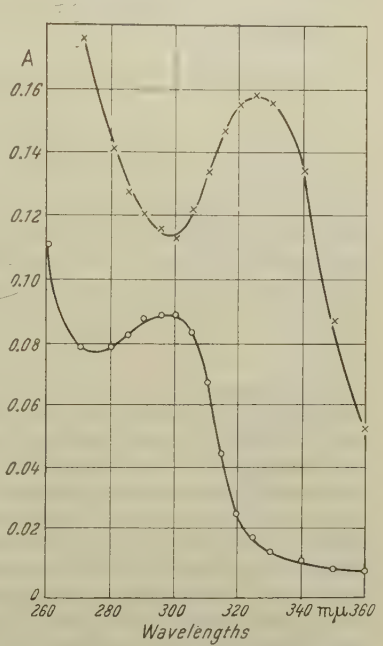


Fig. 2. The Effects of Cupric Ions on the Ultraviolet Absorption Spectrum of Thyroxine. — Abscissae, wave lengths mμ.; ordinates, absorbance. X, solution 1 in Table 1; 0, solution 2; △, solution 3; □, solution 4; ▽, solution 5; ●, solution 6; ▲, solution 7. Composition of solutions given in Table 1. Cells, 100 mm. in length. Final concentration of thyroxine, 1.03×10^{-5} M.

If copper and thyroxine form a special type of complex, it would be of interest to examine the biological activity of this complex in order to see if it has special activity not possessed by the metal or thyroxine alone. Considerable interest has been directed to the possible physiological and pharmacological action of metal complexes[10].

Effects of metals chelated to protein are well known in enzyme chemistry. The ability of the cobalt-histidine chelate to take up oxygen reversibility[8] opens the study of synthetic models for biological oxidations. NEUBERG[11, 12, 9] and his associates have described the solubilization of important metabolites by metal complex formation and have discussed the possibility of such reactions aiding in the transport of these compounds. ALBERT[1] has used the concept of chelation in an explanation of selective toxicity. It is hoped that from the present work on copper and thyroxine that a biological function may be found for their possible complexing.

The author wishes to thank Dr. H. E. EVERT for his valuable suggestions and Mrs. E. SOMMERS for her technical aid during this work.

Table. *Composition of Solutions containing Copper and Thyroxine.*

Solution No.	1	2	3	4	5	6	7
Thyroxine, ml.	5	5	5	5	5	—	5
Cupric Acetate, ml.	1	2	3	4	5	5	—
Sodium Acetate, ml.	94	93	92	91	90	90	95
KOH, ml.	—	—	—	—	—	5	—
Total, ml.	100	100	100	100	100	100	100

Concentrations of solutions given in text.

Summary.

By using the absorption band of the hydroxyl group of thyroxine in the ultraviolet, the changes in the spectrum of thyroxine were observed with increasing amounts of cupric acetate. The maximal change was observed with five parts thyroxine and four parts cupric acetate. An explanation of these results is that a complex is formed between copper and thyroxine which involves the hydroxyl group in thyroxine.

References.

[1] Albert, A.: Selective Toxicity, **1951**, 109. London: Methuen and Co. — [2] Crammer, J. L., and A. Neuberger: Biochemic. J. **37**, 302 (1943). — [3] Gemmill, C. L.: J. of Biol. Chem. **192**, 749 (1951). — [4] Gemmill, C. L.: Amer. J. Physiol. **167**, 349 (1951). — [5] Gemmill, C. L.: (In preparation) 1953. — [6] Gemmill, C. L., and R. L. Plunkett: Arch. Biochem. Biophysics **36**, 434 (1952). — [7] Gibson, K. S.: Spectrophotometry, Natl. Bureau of Standards Circular **484**, 44 (1949). — [8] Hearon, J. Z., D. Burk and A. L. Schade: J. Nat. Cancer Inst., Wash. **9**, 337 (1948 to 1949). — [9] Mandl, I., A. Grauer and C. Neuberg: Fed. Proc. (Washington) **11**, 253 (1952). — [10] Martell, A. E., and M. Calvin: Chemistry of Metal Chelate Compounds, Prentice-Hall, New York, 1952. — [11] Neuberg, C., and I. Mandl: Arch. Biochem. **19**, 149 (1948). — [12] Neuberg, C., and I. S. Roberts: Arch. Biochem. **20**, 185 (1949). — [13] Spies, J. R.: J. of Biol. Chem. **195**, 65 (1952). — [14] Stenström, W., and N. Goldsmith: J. Physic. Chem. **30**, 1683 (1926).

Prof. Chalmers L. Gemmill,
University of Virginia, Charlottesville, Virginia.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 115—118 (1953).

Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Maryland, Baltimore, USA.

Anesthesia XLII. The Oil/Water Coefficient and Water Solubility of Volatile Anesthetics*.

By

Go Lu, Frederick K. Bell, C. Jelleff Carr and John C. Krantz jr.**.

With 2 figures in the text.

(Eingegangen am 16. Februar 1953.)

In 1847, v. Bibra and Harless[1] first noted that the narcotics are capable of dissolving fats, and they attributed the narcotic action to the dissolving of fatty substances in nervous tissue. Almost thirty years later, Hermann[2] showed that all the aliphatic narcotics dissolve red blood cells which are rich in lipoid substances. In connection with this property he then emphasized the possible significant role of the dissolving of these substances in brain by narcotics in producing their action. In 1891, Pohl[3] further pointed out that the uneven distribution of chloroform between red blood cells and plasma is due to the difference in their lipid content. In 1893, Richet and Houdaille, however, argued that the toxicities of narcotics are inversely proportional to their water solubilities. Although these early findings were fragmentary and less conclusive, they all pointed to a common objective, that there must be a certain relationship existing between the efficiency and the physical characteristics among narcotic agents.

At the turn of the century Meyer and Overton[4, 5], using experimental methods, independently demonstrated the close parallelism between narcotic efficiency and the oil/water coefficient usually determined with olive oil. The narcotic efficiency was evaluated on tadpoles. In later years, K. H. Meyer and his associates[6] used oleyl alcohol instead of olive oil to determine the oil/water coefficient in order to secure a closer approximation to the native lipids. He also modified the determination of the solubility coefficient by using oil/gas phase which was believed to resemble better the natural condition. Despite these improvements and the wide acceptance of the "Meyer-Overton Theory", it represents for the most part a statement of narcotic distribution or transportation in the body rather than a theory for narcosis. On the other hand, exceptions have occurred in many respects. The influence of temperature on narcotic efficiency is not always parallel to the oil/water coefficient[7]. The critical narcotic concentrations always vary for different tissues, different animals, and even for different ages of the same animal[7]. Clark[8] found that there is no parallelism between the effects of the narcotics studied on frog heart and their oil/water coefficients. Further, the theory applies only to the aliphatic narcotics. Other water-soluble and saline central depressants do not follow the principle[7].

Recently, Collander[9] produced evidence to show that the orientation of lipid molecules in ordinary lipids is entirely different from that in the cell membrane.

* The expense of this investigation was defrayed in part by a grant from the Ohio Chemical and Surgical Equipment Co., Cleveland, Ohio.

** In honor of Dr. Otto Loewi on his 80th birthday.

This finding argues strongly against the basic concept of the "Meyer-Overton Theory", since they directly applied the data obtained from ordinary lipids to interpret the narcotic potency which likely involved the cell membrane. Camphor is a compound with a high oil/water coefficient, yet it acts as a convulsive agent. Nitrogen, hydrogen and ether have very similar coefficients of solubility between olive oil and water; however, their effects on the central nervous system vary tremendously[10].

In studies with the development of new volatile anesthetics during the past years in this laboratory we[11] have observed that despite all precautions in technique in determining the oil-water coefficient of many volatile anesthetics, the variations in a series of analyses is rather high. However, in the series of narcotic agents studied, we have found the simple determination of the water solubility to bear a striking relationship to the biological potency. This datum appears to be a

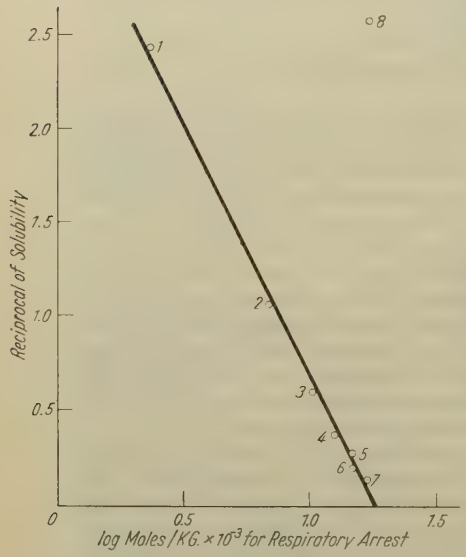


Fig. 1.

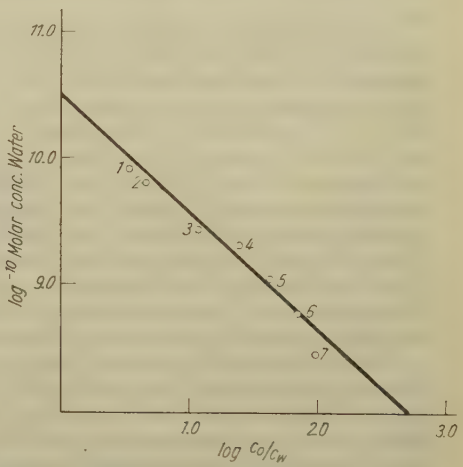


Fig. 2.

Fig. 1. 1. Chloroform, 2. Vinyl ether, 3. Ethyl n-propyl ether, 4. Cypreth ether, 5. Allyl methyl ether, 6. Cyprome ether, 7. Ethyl ether, 8. Trifluoro-ethyl vinyl ether.

Fig. 2. Log solubility in water and log oil/water coefficient. — 1. Diethyl ether, 2. Cyclopropyl methyl ether, 3. Cyclopropyl ethyl ether, 4. Divinyl ether, 5. Cyclopropyl vinyl ether, 6. Isopropenyl vinyl ether, 7. Trifluoro-ethyl vinyl ether.

more faithful physical index to the narcotic activity rather than the oil-water coefficient. Besides, the simplicity of determination bespeaks its general applicability. The typical relationship is illustrated in figure 1.

Furthermore, we[12] have also shown that with certain ethers studied the logarithm of the water solubility of individual ethers is definitely a function of the logarithm of its corresponding oil/water coefficient. The linear relationship is shown in figure 2. Therefore we have advocated that the latter can be approximated by a simple determination of its water solubility and by protraction from the curve.

Recently our interest has been directed to the investigation of the fluorinated aliphatic low member hydrocarbons and ethers for their possible narcotic efficiency. Certain findings which resulted were very

interesting, which further added to the facts contrary to the "Meyer-Overton Theory". For example, we observed that perfluoroethyl ether (C_2F_5—O—C_2F_5) was inert when inhaled by dogs in concentrations up to 75 per cent. In addition, trifluoroethyl vinyl ether (CF_3—CH_2—O—CH $=CH_2$), a liquid with a B.P. of 42.6° C. at 760 mm. Hg, was found to be an anesthetic upon inhalation by a number of species. Its potency is approximately equal to that of Ether, U.S.P. Its water solubility was determined to be 0.4 cc $\pm$ 0.05/100 cc. water at 30° C. in contrast to that of Ether, U.S.P. 8.6 cc $\pm$ 0.5/100 cc. water at 25° C.[13]. The oil/water coefficient of trifluoroethyl vinyl ether was determined from the distribution of the ether between water and Corn Oil, U.S.P., by methods developed in this laboratory.

The distribution procedure was essentially that set forth by Cone *et al.* (1941). The ether in the aqueous layer was determined colorimetrically. The method depends upon the saturation of the double bond in the ether with a standard solution of bromine in potassium bromide solution. The excess bromine is determined spectrophotometrically, using a standard calibration curve prepared by analysis of solutions of known ether content.

From eight determinations the oil/water coefficient of trifluoroethyl vinyl ether was found to be 94 $\pm$ 3. By calculation from the curve of Carr, Kibler and Krantz (1944) in which water solubility is plotted against oil/water coefficient, the value is found to be 100 $\pm$ 5. It is of interest that this value is greater than that of the potent anesthetic chloroform, yet trifluoroethyl vinyl ether is about as potent as ethyl ether.

This fact is contrary to the well-known "Meyer-Overton Theory". Similarly, the anesthetic potency of this compound is also far out of proportion to the reciprocal of its water solubility in respect to the values of Ether, U.S.P.

Conclusion and Summary.

Trifluoroethyl vinyl ether is sparingly soluble in water and possesses a very high oil/water coefficient, even greater than that of chloroform, yet its anesthetic potency is approximately the same as that of Ether, U.S.P.

This finding constitutes a new fact strongly opposing the well-known "Meyer-Overton Theory". There is also an exception in the use of the reciprocal of the water solubility of volatile anesthetics to approximate the anesthetic potency. Therefore it appears that neither of these procedures is a faithful criterion with which to estimate the potency of fluorinated ethers.

References.

[1] Kochmann, M.: Heffters Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Erster Band, 451 pp. Berlin: Springer 1923. — [2] Kochmann, M.: Heffters Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Erster Band, 452 pp. Berlin: Springer

1923. — [3] Pohl, J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **28**, 239 (1891). (Through Kochmann, M.: Heffters Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, 452 pp. Berlin: Springer 1923.) — [4] Meyer, H. H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **42**, 109 (1899). (Through Kochmann, M.: Heffters Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, 452 pp. Berlin: Springer 1923.) — [5] Overton, E.: Studien über die Narkose. Jena 1901. (Through Kochmann, M.: Heffters Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, 452 pp. Berlin: Springer 1923.) — [6] Meyer, K. H.: Heffters Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk, Zweiter Band, 254—256 pp. Berlin: Springer 1936. — [7] Sollmann, T.: A Manual of Pharmacology, 7th ed., 604 pp. Philadelphia: W. B. Saunders Company 1948. — [8] Clark, A. J.: Heffters Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk, Vierter Band, 82 pp. Berlin: Springer 1937. — [9] Collander, R.: Acta physiol. Scand. **13**, 363 (1947). — [10] Butler, T. C.: J. of Pharmacol. **98**, II, 121 (1950). — [11] Cone, N. M., S. E. Forman and J. C. Krantz jr.: Proc. Soc Exper. Biol a. Med. **48**, 461 (1941). — [12] Carr, C. J., D. Kibler and J. C. Krantz jr.: Anesthesiology **5**, 495 (1944). — [13] U. S. P. XIV, Easton, Pennsylvania, 1950, 233 pp.

Prof. John C. Krantz jr.,
University of Maryland, 29[5]. Greene Street, Baltimore, USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 119—129 (1953).

Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, University of California School of Medicine, San Francisco.

Dodecylamine and other agents active against Ascaris lumbricoides and their toxicity in mammals*.

By

HAMILTON H. ANDERSON and GEORGE K. HURWITZ**.

(Eingegangen am 2. Februar 1953.)

Recent renewed interest on the part of BALDWIN and MOYLE (1949) in the physiology and pharmacology of *Ascaris lumbricoides suis* has emphasized the need of more effective anthelmintic agents. Since 1930, when LAMSON and his associates introduced hexylresorcinol against ascarides, no significant additions to our effective anthelmintics have been made. LAMSONs technic, a method based on the use of intact specimens of the pig ascaris, has been employed in the present study, utilizing hexylresorcinol as a standard for comparison.

On the other hand, it is admitted that BALDWINs more exacting technic, utilizing an anterior "sausage" preparation of the helminth which permits testing of certain agents, notably santonin, on the central nervous system or the nerve ring of the helminth, is useful. A second, "intermediate" preparation, from the region immediately in front of the genital pore, is also used by BALDWIN. Each segment is from 2,0 to 2,5 cm in length. Apart from localizing the site of action, BALDWIN and MOYLE (1949) have been concerned with two other factors important in the *in vitro* appraisal of potential anthelmintics. These are: a) some agents may fail to penetrate the cuticle, which has been shown by TRIM (1944) to have highly selective permeability; and b) nematode tissues might be relatively insensitive to substances having powerful pharmacologic effects on various mammalian tissues. It was shown that the resistance of "sausage" preparations to some pharmacologic agents was sometimes due to the protective action of the cuticle.

For this reason, primarily, in the present study we have used a modification of the LAMSON and BROWN method (1936), in which intact ascarides were the test objects. For an initial screening procedure, such a method has advantages over other, perhaps more precise methods of testing, since our modification is more physiologic and comparable to conditions encountered in the gut of the host.

With respect to use of other nematodes, PARNELL and MACKIE (1952) have suggested that the larval forms of free-living sclerostomes be used. Unfortunately, as in the work of previous investigators with leech and earthworm preparations,

* In honor of Dr. OTTO LOEWI on his 80th birthday.

** Supported in part by the Shell Development Company, Emeryville, California.

little correlations seems to exist between agents of known anthelmintic activity and the great variety of chemical types examined by these investigators. Further, Wright and Schaffer (1932) found, on the basis of *in vivo* tests against hookworm infections of dogs, that anthelmintic effect depended upon solubility in water, length of carbon chain, and the position of the halogen in the molecule. No such correlation was noted by Parnell and Mackie. For them, solubility was no guide, and there was no correspondence between boiling points, molecular weights, vapor pressures, and larvicidal values.

In vivo testing, utilizing the mouse pinworm *Aspiculuris tetraptera*, has given misleading information so far as correlation with human infections is concerned (Wells, 1952). However, it is possible that another mouse nematode, *Syphacia obvelata*, may prove to be more satisfactory (Chan, 1952).

However, the method of Wright and Schaffer (1932) must be included in the total appraisal of potential anthelmintics, prior to the use of new agents in man.

On the other hand, it is of considerable interest to note that dodecylamine* and its γ-chloroallyl derivative have shown activity against other pathogens or reservoirs of parasites. Fuller (1942) has reported on the activity of dodecylamine against bacteria. Also, a bulb and stem nematode of onions, *Ditylenchus dipsaci*, is susceptible to its action, according to the studies of others, and more recently these agents have been found to be active molluscicides (unpublished data).

Other Studies.

Previous to 1930, oil of chenopodium and santonin were the most effective drugs available for use against ascarides. However, both were undesirable in several respects and investigations were undertaken to obtain newer and safer agents. The earliest contribution to this effort was made by Johnson and Lane (1921), who introduced alkyl radicals into the resorcinol molecule and found that bactericidal action increased with increase in length of the alkyl chain. After this and several other observations, it remained for Lamson, Ward and Brown (1930) to investigate the action of hexylresorcinol on *Ascaris lumbricoides*. Although very active, it was found to have a local irritant action on the mucous membranes of the mouth, esophagus, and stomach of treated patients. Heptylresorcinol, investigated by Lamson, *et al.* (1932), was not any more satisfactory. A continued search was made by Lamson and his colleagues (1935 and 1936) to find a compound which was as effective as hexylresorcinol but which did not have its undesirable properties. They examined a large number of hydroxybenzenes without finding a more satisfactory drug.

Since that time many investigators have examined the activity of phenol derivatives by means of *in vitro* experiments. Anderson and Sah (1942), and Anderson (1950) found that dibromohexylresorcinol was effective, and devoid of irritant properties. Williams, *et al.* (1949) have more recently investigated several halogen-substituted hydroxybenzenes and found that 2-ethyl-4-chloro-6-hexylresorcinol was more active than hexylresorcinol, but still irritant. Dunker (1950) synthesized several active fluorine-substituted phenols, and Hashimoto (1952) found that p-benzylphenol was active and less toxic to mice than hexylresorcinol. In 1951,

* Dodecylamine should be handled with care, since one of six people engaged in working with it in our laboratory developed a dermatitis, characterized by "blood blisters" on two fingers.

Yamasaki *et al.* reported on the experimental and clinical use of octychlororesorcinol in Japan.

Other compounds, unrelated to hexylresorcinol, have been used effectively in domestic animals. Enzie, *et al.* (1945) found sodium fluoride superior to both santonin and oil of chenopodium for eradicating ascarides from swine. His results were confirmed by Foster, *et al.* (1948). In later investigations Enzie (1947) studied toluene derivatives and found that the introduction of halogens into the ring reduced anthelmintic activity. For canine infections, the following compounds were used successfully: methyl chloroform by Enzie (1945) and cashew oil by Eichbaum (1947) and Leão and Eichbaum (1947), and hetrazan by Hewitt, *et al.* (1948). While it had been thought for many years that the active component of oil of chenopodium was ascaridole, it remained for Schenck and Schulze-Buschoff (1948) to synthesize the compound and use it clinically. More recently, Wenzel and Gibson (1951) have studied the toxicity and anthelmintic activity of n-butylidene chloride. They found it effective against ascarides *in vitro*.

While previous investigations have resulted in the study of many new compounds, at present no drug appears to be more acceptable for use as an ascaricide for man than hexylresorcinol. The present research was undertaken with the purpose of determining the anthelmintic value of 20 compounds which were found to be available from the laboratories of the Shell Development Company. Hexylresorcinol was used as a standard for comparison in all experiments.

Methods and Results.

A. In vitro studies.

1. Method.

Before attempting to use an anthelmintic in man, it is necessary to obtain as much information as possible by *in vitro* and other laboratory animal experiments, and to determine the toxicity of the drug in mammals.

Since the *Ascaris lumbricoides* of man is not available in sufficient quantity for experimental work, it is necessary that nematodes from some other animal be used for *in vitro* studies. Earlier workers, such as Trendelenberg (1916), used earthworms and determined the effect of drug solutions upon activity of the worm. However, earthworms are free-living and belong to a different animal phylum, so that the correlation between activity against ascarides and earthworms has been questioned by many recently. As a result, Lamson and Brown (1936) selected for their studies the *Ascaris lumbricoides* of swine, which closely resembles that of man, although it is not identical. Their experiments consisted of immersing the entire worm into drug solutions and noting the effect upon motility. Lamson and Ward (1936) compared the effects of several chemicals upon the *Ascaris lumbricoides* of swine and the earthworm, and found a correlation in only 6 per cent of cases. Oelkers and Rathje (1941), however, reported comparable results. Rebello and Rico (1926) were the first to study the muscular activity of fragments of ascaris; and Baldwin (1943a) and Baldwin and Moyle (1947) devised a new *in vitro* technic. Using isolated segments of the worm and attaching one end to a kymograph lever, they observed the effect of agents on neuromuscular activity. Kerr and Cavett (1951) simplified the procedure by using the entire worm and recording muscular

contractions. However, the examination of anthelmintic action on worms *in vitro* may lead to error in assessing anthelmintic efficiency. Agents may be converted in the body to more active compounds, or may become inactivated by intestinal contents. Realizing this, Rogers (1944) studied worms *in situ* in the perfused intestines of laboratory animals and ascertained the effects of bile and mucin on drug activity. Fushimi (1951) has recently investigated the variability of the ascarides themselves, and has shown that such factors as length, weight, color, and sex influence results obtained in *in vitro* experiments.

Ascaris lumbricoides was obtained from freshly killed dogs at a local slaughterhouse and immersed immediately in warm 0,9 per cent sodium chloride solution in a thermos jug. In the laboratory, the worms were kept in 0,9 per cent sodium chloride solution in a water bath at 37° C until use. The chemical to be tested was diluted approximately 1:1000 by adding 0,3 Gm. (or 0,3 ml) to 300 ml of 0,9 per cent sodium chloride in a 600 ml beaker. If the compound was insoluble in water, it was first dissolved in either ethyl alcohol, acetone, or hydrochloric acid solution, and then added to the 300 ml of saline. It was stirred by a mechanical stirrer until a uniform suspension was obtained. Controls included exposing the worms to the solvents alone, plus saline. The worms were placed in such suspensions, which were maintained at 37° C in the water bath during the experiment. At intervals of ten minutes the ascarides were examined for evidence of drug action. If the worms were active in the drug solution, they were classified as "alive". If there was no evidence of movement, they were "stimulated" by placing them in a beaker of water at a temperature of from 50 to 60° C. If they showed evidence of movement in two directions, they were again classified as "alive". Otherwise they were assumed to be dead. The experiment was concluded after one hour. This technic is different from the original in that we examined the worms *immediately* for the effects of the drug. Lamson and Brown (1936) removed ascarides from the drug solutions at designated time intervals and placed them in 0,9 per cent sodium chloride at 37° C for 20 hours, before determining the degree of injury caused by the agent. They felt that (1) some agents might have a delayed but lethal action, and (2) some agents might temporarily paralyze but not kill the worm. While it is quite true that some chemicals may have a delayed lethal action, it is more realistic in comparing *in vitro* studies with clinical application to determine the immediate effects, since administration of an anthelmintic is generally followed shortly by a saline purge. Concerning the second point, agents found to be active within 30 min were examined by the original method, and no difference in results was obtained. While there are admitted objections to the use of our method, it is simpler, utilizes fewer worms, and eliminates several errors in the original technic. Controls were used throughout, and other conditions stated by the authors were adhered to. Each agent was tested until consistent results were obtained, and after a few (at least four) worms were used initially, repeated tests with larger numbers were made with all active compounds. Chemicals which killed all ascarides within 30 min were subjected to mammalian toxicity and surface tension tests.

2. Results.

The agents tested were divided into three goups according to their activity. In the first two groups, agents are listed in decreasing order of activity. It is seen that dodecylamine (DOD), γ-chloroallyl dodecylamine (CADA), and allyl isothiocyanate (AITC)* are in the same class with hexylresorcinol (HEX). Table 1 summarizes our findings.

* mustard oil.

Table 1. *Activity of various agents against Ascaris lumbricoides in vitro.*

Group Number	Agent
Group I (agents which killed all worms in 30 min)	Hexylresorcinol (HEX)*
	Allyl isothiocyanate (AITC)
	Dodecylamine (DOD)
	α-chloroallyl dodecylamine (CADA)
Group II (agents which killed all or some worms in 30 to 60 min)	1-Chloro-3-bromopropene-1
	2-Chloro-3-bromopropene-1
	1,4-dibromo-2-chloro-2-butene
	Tetradecylamine
Group III (agents which killed no worms in 60 min)	Allyl chloroacetate
	Cetene polymer
	Cinnamaldehyde
	N-decyl alcohol
	N-decylamine
	Dimer of α-neopentyl acrolein
	Ethyl chloroacetate
	Glycidyl p-chlorophenyl ether
	2-Heptadecyl-4,4,6-trimethyl-tetrahydropyrimidine
	n-Heptaldehyde cyanohydrin
	Methyl caprylate
	Methyl caprate

* Standard agent for comparison.

B. Peroral toxicity Studies.

1. Methods.

The peroral toxicities were determined in female rats (100—200 Gm.) and mice (15—25 Gm.). Agents were dissolved in propylene glycol and given in total volume not to exceed 20 ml/kg, and administered into the esophagus by blunt needle, each animal receiving a single dose. All of six animals in each group were observed for ten days, and the ALD (approximate lethal dose) or the approximate LD_{50} (or both) was determined. The gross lesions seen at necropsy were noted, and microscopic sections were made of apparent drug-induced lesions.

2. Results.

While AITC was moderately toxic, HEX, DOD and CADA all fell within the slightly toxic category, and became of possible value as anthelmintics (see Table 2).

C. Eye irration studies.

1. Methods.

For the eye irritation studies, the method described by Carpenter and Smyth (1946) was used. The eyes of five rabbits were subjected to a study of each active agent, with two serving as controls. In each case, 0,1 ml of a 2 per cent solution of the agent in propylene glycol was instilled into the conjunctival sac; 0,1 ml of propylene

Table 2. *Mammalian toxicity of more active agents.*

Agent	Toxicologic Category[1]	Preliminary LD_{50}, Rat[2]	Further LD_{50} Determinations with larger number of animals[3]		
			Mice (Gm./Kg.)	Rats (Gm./Kg.)	
HEX	Slightly toxic	1,42 (0,95—2,13)		[4]	Mottled discolored liver, irritated stomach & duodenum
AITC	Moderately toxic	0,112[5] (0,075—0,169)			Marked irritation of lungs and gastroenteric tract
DOD	Slightly toxic	1,02 (0,50—2,00)	1,16 (1,03—1,31)	1,02 (0,84—1,24)	Irritation of stomach and duodenum
CADA	Slightly toxic	1,50 (0,75—3,00)	1,62 (1,43—1,82)	1,32 (1,22—1,43)	Lung hemorrhage; no gastroenteric irritation

[1] According to tabulation of toxicity classes by Hodge, H. C., and Sterner, J. H., *Am. Indust. Hyg. Assoc. Quart.*, **10**, 93 (1949).

[2] LD_{50} values and their 19/20 confidence limits calculated by the method of Thompson, W. R., *Bact. Rev.*, **11**, 115 (1947).

[3] LD_{50} values and their 19/20 confidence limits calculated by the method of Litchfield, J. T. jr., and Wilcoxon, F. J., *J. Pharmacol. & Exper. Therap.*, **96**, 101 (1949).

[4] Lamson, P. D. et al. (1935) gave the LD_{50} value as equal to 0,7 Gm./kg, using ethylene glycol as the solvent. *Brit. J. Exper. Path.*, **12**, 327 (1931); listed the LD_{50} value as 1,5 Gm./kg, using olive oil as the solvent.

[5] $P = 0{,}001—0{,}01$ when comparison was made with the value of HEX, considered as the standard (see Table 3).

glycol alone was administered to the controls. Observations were made at 1, 24, 48, and 96 hours, and the ocular lesions were graded according to the severity of injury to the cornea, iris, and conjunctiva, the higher scores indicating more severe damage. A 2 per cent fluorescein solution was used to stain the injured corneal surface to facilitate grading of the lesions. It was implied that such tests might indicate possible damage to the mucous membranes of the gut when the agents were administered perorally (see Table 3).

2. Results.

While the results were quite variable, even with the same compound, the irritation due to CADA was consistently lower than that produced by the other agents; HEX, AITC, and DOD produced the more severe reactions. Recovery was complete for CADA within 96 hours.

Table 3. *Degree of conjunctival injury on direct exposure to various agents.*

Agent	Number of Eyes Tested	1 Hour	24 Hours	48 Hours	96 Hours
HEX[1]	1	55[2]	57	49	25
	2	51	43	33	15
AITC	1	21	51	31	5
	2	25	17	12	0
DOD	1	20	51	23	14
	2	39	35	31	10
CADA	1	12	7	7	0
	2	9	16	7	0

[1] Hexylresorcinol is the standard for comparison.

[2] Score was according to Carpenter and Smyth (1946): higher scores indicate greater damage.

D. Surface tension studies.

1. Methods.

The surface tension of a 1:1000 suspension of each agent in distilled water was measured by use of the Du Nouy tensiometer. Distilled water was used as a control. This was an attempt to explain observed injury to tissues on the basis of physical characteristics of the various agents.

2. Results.

HEX, DOD, and CADA lowered the surface tension of the solutions to about the same degree, while AITC had a lesser effect. For HEX this physical effect has been given as an explanation of its possible mechanism of action (Lamson *et al.*); again, hexylresorcinol was used as the standard for comparison.

Table 4. *Comparative surface tension lowering properties of the more active agents.*

Agents Tested	Surface Tension in Dynes/Cm.
Distilled water	71
HEX[1]	28
AITC	46
DOD	27
CADA	33

[1] Hexylresorcinol, the standard for comparison.

Discussion.

A discussion of the relation of chemical structure and physical properties to anthelmintic activity may elicit some of the factors which are related to the efficacy of a given compound.

One of the first attempts to correlate chemical structure with anthelmintic action was made by Caius and Mhaskar (1920). Since the activity of chloroform against hookworms appeared to be associated with its chlorine content, they suggested that some related compound with a higher halogen content might prove more efficient. This initial hypothesis led to the subsequent investigation and use of carbon tetrachloride, and many compounds that are being studied today are halogenated (see Introduction). However, no clear-cut relationship exists between halogen content and degree of anthelmintic activity. Kudicke and Borchardt (1926), as a result of

their experiments, believed that low water solubility was an important factor. In 1932, Wright and Schaffer conducted an extensive series of experiments with chlorinated alkyl hydrocarbons and found that in any one homologus series, anthelmintic efficiency generally increased with the lengthening of the hydrocarbon chain, and that there was a corresponding decrease in water solubility. Harwood (1934) emphasized that melting point was more important than solubility, since all active compounds had melting points below 80° C. Lamson, *et al.* (1935 and 1936) showed in the series of 4-n-alkyl resorcinols that activity increased with increase in length of the alkyl side chain, reaching a maximum at hexylresorcinol, decreasing at the octyl derivative, and absent at dodecylresorcinol.

Our observations indicate greater anthelmintic activity with the dodecylamines and their relatives. The lower members of the series exerted the most intense local irritant action, but the authors concluded that irritant properties were to some extent associated with anthelmintic activity.

Rosenmund (1935) suggested that the physical characters of the phenol lactones were of importance in relation to the anthelmintic action of santonin and its derivatives. Paranjake, *et al.* (1945) studied, *in vitro*, the action of compounds allied to santoin, and Baldwin (1948) made an extensive study of these and other agents. He elicited several factors in each group of compounds which he believed to be related to their activity. Alexander and Trim (1946) pointed out that the lowering of surface tension produced by detergents increased the effectiveness of phenols as ascarides. Rogers (1944) reported that the detergents sodium laurate and sodium oleate in proper concentrations had anthelmintic activity in themselves. We have confirmed this observation with respect to topical action of synthetic detergents against the ova of oxyuris in man (Anderson, 1952).

While it is impossible to correlate the results of the present experimental data with the work of previous investigators, it is interesting to note that:

1. Dodecylamine is a simple, straight-chain or aliphatic amine, which melts at approximately 24° C.
2. HEX, AITC, DOD, and CADA are relatively insoluble in water.
3. N-decylamine and tetradecylamine are not as active as dodecylamine *in vitro*.
4. CADA is less irritating to the rabbit's eye than DOD.
5. Solutions of HEX, DOD, and CADA lower surface tension to about the same degree.

Associated with the structure-action relationship is the problem concerning the exact mode of action anthelmintics. Lamson and Ward (1932) classifield anthelmintic activity into several categories according to whether there was:

1. temporary narcosis or paralysis followed by recovery,
2. narcosis or paralysis followed by death,
3. injury to the cuticle,
4. digestion, or
5. unexplained action.

Later, Brown (1937) found that several agents which he studied, including hexylresorcinol, acted through the cuticle of ascaris in contrast to the idea that the drugs entered the tissues after ingestion by the parasite. However, in the case of phenothiazine, a drug effective against other nematode infections, Davey (1942) found that action occurred only after ingestion. Baldwin (1943a) studied the effect of all the known anthelmintics on segments of ascaris *in vitro* and found that all effective agents except phenothiazine and gentian violet affected the neuromuscular apparatus. The studies of Trendelenburg (1916), Baldwin (1943b), and Kobayashi, *et al.* (1952) indicated that santonin causes tonic muscular contractions followed by paralysis. Bliss (1925) obtained the same effect with oil of chenopodium. However, proteolytic enzymes such as papain digest ascaris. Robbins (1930) showed, that ficin the active principle of lèche de Higuéron, another anthelmintic, caused digestion. Berger and Asenjo (1940) obtained the same effects with the crystalline papain.

Thus, it appears that in most cases the drug is absorbed through the cuticle and then causes paralysis.

As was previously mentioned, one of the chief drawbacks to *in vitro* studies is that a compound may be adversely affected by the host's intestinal contents or be metabolized by the host to a more (or less) active agent.

In this connection, Schill (1943) and Trim (1944) found that the action of hexylresorcinol *in vitro* was inhibited by bile and mucin. In an attempt to explain *in vivo* activity more readily, Boscardi and Coltorti (1951) attempted unsuccessfully to find a mucinolytic substance in extracts of ascaris. Concerning the fate of anthelmintics in the body, Kohgame and Asoda reported as early as 1927 that santonin was not a true anthelmintic, but was changed by the liver to the active compound, which entered the intestine with the bile. This was further suggested by Lamson and Brown (1936), who found that santonin had no effect on *Ascaris lumbricoides in vitro*. de Eds and Thomas (1941) determined that phenothiazine was also altered by the body of the host.

The agents which were effective in this experiment appeared to cause paralysis of the worms without prior stimulation. This is important clinically, in view of the fact that drugs like tetrachloroethylene, which causes stimulation and migration of ascaris, are undesirable, since blockage of biliary tracts or other pathways may occur. Observation of the cuticle of the worms with a dissecting microscope revealed that AITC, DOD, and CADA did not have the blistering effect of HEX. Other conclusions as to mode of action of these compounds cannot be made on the basis of these observations, but the lowering of surface tension may be an important factor in activity.

Summary.

1. Allyl isothiocyanate, dodecylamine, and γ-choroallyl dodecylamine exhibited the same degree of anthelmintic activity as hexylresorcinol on the *Ascaris lumbricoides* of swine *in vitro*.

2. Single peroral doses (from 1.02 to 1.6 Gm./Kg.) of hexylresorcinol, dodecylamine, and γ-chloroallyl dodecylamine have approximately the

same toxic range in mice and rats. Allyl isothiocyanate is moderately toxic in the range of 0.112 Gm./Kg.

3. γ-chloroallyl dodecylamine is less irritating to the membranes of the rabbit's eye than hexylresorcinol, allyl isothiocyanate, or dodecylamine, and has no permanent effect visible at 96 hours.

4. Hexylresorcinol, dodecylamine, and γ-chloroallyl dodecylamine exhibit the same degree of surface activity, which might be given as an explanation for their mechanism of action.

5. Further study is necessary to determine the relationship of structure to action of aliphatic compounds like dodecylamine and γ-chloroallyl dodecylamine, which may have anthelmintic value in both human and animal disease.

6. The active dodecylamines represent a type of agent not previously known to posses anthelmintic properties.

Dodecylamine should be handled with care, since one of six people engaged in working with it in our laboratory developed a dermatitis, characterized by 'blood blisters' on two fingers.

For the statistical analysis of these studies, we are indebted to Dr. Blair Bennet and Mr. Jiro Kodama, and to Dr. M. K. Dunlap for editing of manuscript.

References.

Alexander, A. E., and A. R. Trim: Proc. Roy. Soc. Lond. **133**, 220 (1946). — Anderson, H. H.: Personal Communication, 1950. — Anderson, H. H., and P. P. T. Sah: Fed. Proc. **1**, 142 (1942). — Baldwin, E.: Parasitology **35**, 89 (1943a). — Pharm. J. London, **151**, 22 (1943b). — Brit. J. Pharmacol. **3**, 91 (1948). — Baldwin, E., and V. Moyle: J. Exper. Biol. (London) **23**, 277 (1947). — Brit. J. Pharmacol. **4**, 145 (1949). — Berger, J., and C. F. Asenjo: Science (Lancaster, Pa) **91**, 387 (1940). — Bliss, A. R.: J. Labor. Clin. Med. **10**, 456 (1925). — Boscardi, F., and M. Coltorti: Riv. parassit., Roma. **12**, 257 (1951). — Abstr. Trop. Bull.. London **49**, 285 (1952). — Broom, W. A.: Brit. J. Exper. Path. **12**, 327 (1931). — Brown, H. W.: Amer. J. Hyg. **26**, 72 (1937). — Caius, J. F., and K. Mhaskar: Indian. J. Med. Res. **8**, 379 (1920). — Carpenter, C. P., and H. F. Smyth jr.: Amer. J. Ophthalm. **29**, 1363 (1946). — Chan, K. F.: Amer. J. Hyg. **56**, 22 (1952). — Davey, D. G.: Vet. Bull., Wash. **12**, R7 (1942). — De Eds, F., and J. O. Thomas: J. of Parasitol. **27**, 143 (1941). — Draize, J. H., G. Woodard and H. O. Calvery: J. of Pharmacol. **82**, 377 (1944). — Dunker, M. F. W.: J. Amer. Pharmaceut. Assoc. (Scient. Ed.) **39**, 437 (1950). — Eichbaum, F. W.: Mem. Inst. Butantan. (port.) **20**, 203 (1947). — Abstr. Trop. Dis. Bull., London **46**, 54 (1949). — Enzie, F. D.: Proc. Helminth Soc. Wash. **12**, 24 (1945); **14**, 35 (1947). — Enzie, F. D., R. T. Habermann and A. O. Foster: J. Amer. Vet. Med. Assoc. **107**, 57 (1945). — Findlay, G. M.: Recent Advances in Chemotherapy, 1st ed., 2nd ed., 1939, 3rd ed., P. Blakiston's Son & Co., Inc., Philadelphia 1950, Vol. I. — Foster, A. O., F. D. Enzie, R. T. Habermann and R. W. Allen: Amer. J. Vet. Res. **9**, 379 (1948). — Fuller, A. T.: Biochemic. J. **36**, 548 (1942). — Fushimi, J.: Osaka Daigaku Tgaku Zassi. **2**, 407 (1950); **3**, 145, 223, 387 (1951). — Harwood, P. D.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **32**, 131 (1934). — Hashimoto, Y.: Folia Jap. Pharmacol. **48**, 52 (1952). — Hewitt, R., W. Wallace, E. White and Y. Subbarow: J. of Para-

sitol. **34**, 237 (1948). — Johnson, T. B., and F. W. Lane: J. Amer. Chem. Soc. **43**, 348 (1921). — Kerr, K. B., and J. W. Cavett: Exper. Parasitol. **1**, 161 (1952). — Kobayashi, Y., T. Bando and T. Ishizaki: Jap. J. Pharmacol. **1**, 130 (1952). — Kohgame, Y., and J. Asoda: Jap. Med. World **7**, 115 (1927). — Kudicke, R., and W. Borchardt: Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. **30**, 467 (1926). Through G. M. Findley, Recent Advances in Chemotherapy. — Lamson, P. D., C. B. Ward and H. W. Brown: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. **27**, 1017 (1930). — Lamson, P. D., E. L. Caldwell, H. W. Brown and C. B. Ward: Amer. J. Hyg. **15**, 306 (1932). — Lamson, P. D., and C. B. Ward: J. of Parasitol. **18**, 173 (1932). — Lamson, P. D., and H. W. Brown: Amer J. Hyg. **23**, 85 (1936). — Lamson, P. D., and C. B. Ward: Science (Lancaster, Pa) **84**, 293 (1936). — Lamson, P. D., H. W. Brown and C. B. Ward: J. of Pharmacol. **53**, 198 (1935). — Lamson, P. D., R. W. Stoughton and A. D. Bass: J. of Pharmacol. **56**, 50 (1936). — Leão, A. T., and F. W. Eichbaum: Mem. Inst. Butantan. **20**, 13 (1947). Abstr. Trop. Dis. Bull., London **46**, 54 (1949). — Oelkers, H.-A., and W. Rathje: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **198**, 317 (1941). Abstr. Trop. Dis. Bull., London **39**, 767 (1942). — Parnell, I. W., and A. Mackie: Brit. J. Pharmacol. **7**, 509 (1952). — Paranjape, K. D., N. L. Phalnikar, B. V. Bhide and K. S. Nargund: J. Indiana Med. Assoc. **14**, 69 (1945). Abstr. Trop. Dis. Bull., London **42**, 571 (1945). — Rebello, S., and J. T. Rico: C. r. Soc. Biol., Paris **94**, 915 (1926). Through G. M. Findlay, Recent Advances in Chemotherapy. — Robbins B. H.: J. of Biol. Chem. **87**, 251 (1930). — Rogers, W. F.: Parasitology **36**, 98 (1944). — Rosenmund, K. W.: Angew. Chem. **48**, 701 (1935). Through G. M. Findlay, Recent Advances in Chemotherapy. — Schenck, G. O., and H. Schulze-Buschoff: Dtsch. med. Wschr. **73**, 341 (1948). Abstr. Trop. Dis. Bull., London **46**, 384 (1949). — Schill, E.: Dtsch. tropenmed. Z. **47**, 105 (1943). Abstr. Trop. Dis. Bull., London **40**, 790 (1943). — Trendelenberg, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **79**, 190 (1916). Through G. M. Findlay, Recent Advances in Chemotherapy. — Trim, A. R.: Parasitology **35**, 209 (1944). — Wells, H. S.: J. Inf. Dis. **89**, 190 (1951). — Wenzel, D. G., and R. D. Gibson: J. Pharmacy & Pharmacol., London **3**, 169 (1951). — Williams, W. D., V. Schelling and F. W. Hartman: Amer J. Trop. Med. **29**, 241 (1949). — Wright, W. H., and J. M. Schaffer: Amer. J. Hyg. **16**, 325 (1932). — Yamasaki, H., C. Mannami and H. Mayeda: Jap. J. Pharmacol. **1**, 63 (1951).

Hamilton H. Anderson, M. D., Dept. of Pharmacology, Experimental and Therapeutics, University of California, San Francisco 22, California, USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 130—137 (1953).

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering A.G., Berlin-West.

Chemische und pharmakologische Eigenschaften des Aethinylcyclohexylcarbaminsäureesters*.

Von

H. Langecker, H. J. Schümann und K. Junkmann.

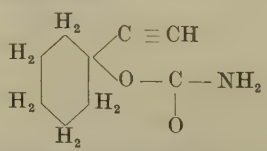
(Eingegangen am 2. Februar 1953.)

Seit der Entdeckung des Chloralhydrats als erstes synthetisches Schlafmittel ist eine große Anzahl anderer Präparate entwickelt worden. Trotzdem hat die Suche nach immer besseren Mitteln noch kein Ende gefunden, wie z. B. die Empfehlung des 3,3-Diäthyl-2,4-dioxytetrahydropyridins[8] und 3-Methylpentin-(1)-ols(3)[4] zeigt. Dies beweist, daß die große Auswahl der zur Verfügung stehenden Präparate immer noch Wünsche offen läßt, sei es, Nebenwirkungen oder Nachwirkungen zu vermeiden, sei es, Mißbrauch und Gewöhnung vorzubeugen.

Mit dem 3-Methylpentin-(1)-ol(3)[4] war ein Stoff aus der Klasse der tertiären Alkohole als Schlafmittel empfohlen worden, die bisher unter den gebräuchlichen nur durch Amylenhydrat vertreten war. In eigenen Tierversuchen haben wir diesen durch seine flüssige Zustandsform für die klinische Anwendung etwas benachteiligten Stoff eher als Sedativum kennen gelernt.

Da die Möglichkeit einer Verstärkung der Alkoholwirkung durch Veresterung mit Carbaminsäure seit langer Zeit bekannt war, haben wir in der Klasse der Carbaminsäureester tertiärer ungesättigter Carbinole nach neuen brauchbaren Schlafmitteln gesucht, dies insbesondere deshalb, da unseres Wissens diese Körperklasse bisher keine Beachtung gefunden hat. Aus einer großen Reihe hierher gehöriger Verbindungen haben wir den Aethinylcyclohexylcarbaminsäureester im Tierversuch als geeignetes Schlafmittel erkannt. Wir wollen im folgenden einiges über seine chemischen und pharmakologischen Eigenschaften berichten.

Chemische Eigenschaften. Aethinylcyclohexylcarbaminsäureester (*I*) $C_9H_{13}O_2N$, Mol. Gew. 167, Konstitutionsformel:



bildet farblose, geruchlose, schwach bitter schmeckende stäbchenförmige Kristalle, Fp. 96—98°, Kp. 3 118—122°, ist optisch inaktiv und zeigt bis 220 Å keine UV-

* Herrn Professor Dr. Otto Loewi zum 80. Geburtstag.

Absorption. Bei 25° ist es in Wasser 0,25, in Äthylalkohol 35,0, in Hexan 2,0, in Sesamöl 0,7%ig löslich. *I* ist in 100%igem 1,2-Propylenglykol 22%ig, in 60%igem wäßrigen Propylenglykol 45%ig und in 30%igem 0,8%ig löslich. *I* ist bei 30° in 1,0 n-Schwefelsäure stabil, bei 40° spaltet 1/10 n-Säure und bei 60° schon 1/50 n-Säure. In alkalischem Milieu tritt bei 30° in 1/100 n-Natronlauge unter Kohlensäureabspaltung bereits Zersetzung ein. In Wasser oder in Lösung von 1,2-Propylenglykol erfolgt bei 50° in 18 Std unter Sauerstoffatmosphäre keine Oxydation.

Der Brechungskoeffizient n_D von Propylenglykoll-Lösungen (5,0, 10,0, 15,0, 20,0% bei 21,5° ist* = 1,4350, 1,4383, 1,4415, 1,4441. n_D-Propylenglykoll = 1,4263.

Oberflächenspannungserniedrigung (gesättigte wäßrige Lösung — Δo bei 22°): 21%.

Der Verteilungsquotient Öl/Wasser beträgt 1,48, der des Carbaminsäureäthylesters 0,14 (KOCHMANN[3]).

Nachweismethoden. Als Äthinylverbindung bildet *I* einen schwer löslichen Silberkomplex[6], der zum Nachweis mit der Einschränkung benutzt werden kann, daß er nicht zwischen unverändertem Carbaminsäureester und dem zugehörenden Carbinol zu unterscheiden gestattet. Dagegen erhält man mit Sublimat nur mit dem unveränderten Carbaminsäureester eine Fällung, die sich zum Nachweis der ungespaltenen Verbindung eignet. Auf diesen beiden Möglichkeiten haben wir zwei Methoden des Nachweises im Harn aufgebaut.

a) Prinzip: Extraktion des Harns bei p_H 8 mit CH_2Cl_2 und Fällung von *I* mit ammoniakalischer Silberlösung im Extrakt, Zerlegung der Silberverbindung mit Salpetersäure und Bestimmung der Silberionen durch Titration mit Dithizon.

Reagentien: 1. Doppelt destilliertes Wasser, 2. CCl_4 (destilliert), 3. Ammoniak konz., 4. Salpetersäure konz., 5. CH_2Cl_2, 6. Ammoniakalisches Silberreagens: 12,5 cm³ n/10 Silbernitrat werden mit 1,5 cm³ 6 n-NaOH versetzt, der entstandene Niederschlag in konzentriertem Ammoniak aufgelöst und nach Zugabe von einem weiteren Kubikzentimeter konz. Ammoniak auf 25 cm³ aufgefüllt.

7. Dithizonreagens: 10 mg Diphenylthiocarbazon werden in 50 cm³ CCl_4 gelöst, mit gleichem Volumen wäßriger Ammoniaklösung (1 cm³ konz. ad 200 Wasser), geschüttelt (Dithizon geht dabei in die Ammoniakphase, Verunreinigungen bleiben im CCl_4 zurück), die CCl_4-Schicht wird abgelassen, die Wasserphase mit neuem CCl_4 unterschichtet und nach Ansäuern geschüttelt, wobei das Dithizon wieder in CCl_4 übergeht. Nach neuerlichem Waschen mit Wasser wird durch ein trockenes Filter filtriert und auf 150 cm³ mit CCl_4 aufgefüllt. Bei Aufbewahrung in brauner Glasstöpselflasche unter 1%iger Schwefelsäure ist das Reagens 1 Monat lang haltbar.

Ausführung: 75 cm³ Harn werden mit konz. Ammoniak auf p_H 8 gebracht und zweimal mit je 75 cm³ CH_2Cl_2 in einem Scheidetrichter ausgeschüttelt. Nach Abtrennen der Wasserphase werden die vereinigten CH_2Cl_2-Extrakte durch Zentrifugieren von einer eventuell entstandenen Emulsion abgetrennt. Die Emulsion wird einmal mit CH_2Cl_2 gewaschen, Waschung und Extrakt in einem Scheidetrichter vereinigt und nach Zugabe von 5—15 cm³ Silberreagens 30 min lang geschüttelt. Dabei tritt ein in der Wasserphase fein verteilter Niederschlag auf. Die blanke, braungefärbte CH_2Cl_2-Phase wird abgelassen und verworfen. Die trübe Wasserphase wird in ein Zentrifugenglas abgelassen, der Scheidetrichter 1—2mal mit Wasser gewaschen und in den vereinigten Wasserphasen die Reste von CH_2Cl_2 unter Durchleiten von Luft entfernt. Der Niederschlag wird durch Zentrifugieren abgetrennt, auf der Zentrifuge mit Wasser silberfrei gewaschen und nach Zugabe von 2 cm³ Salpetersäure 1 Std in einem kochenden Wasserbad gehalten, auf 250 cm³ aufgefüllt und eventuell filtriert.

* Nach Messungen von H. RÖPKE.

Zur Durchführung der Titration wird 1 cm³ des Filtrats mit 9 cm³ Wasser verdünnt und so lange aus der Bürette mit Dithizonreagens versetzt, bis nach dem Durchschütteln die CCl_4-schicht grün gefärbt bleibt. (Silberionen geben mit Dithizon einen gelbgefärbten, in CCl_4 löslichen Komplex. Das Dithizonreagens in CCl_4 ist grün gefärbt.) Zur Feststellung dieses Endpunktes ist es erforderlich, daß der gebildete Silberkomplex abgetrennt wird. Deshalb geht man so vor, daß man aus der Bürette in kleinen Anteilen zur Silberlösung Reagens hinzufügt, durchschüttelt und jedesmal die CCl_4-Schicht abläßt und die Wasserphase vor dem nächsten Zusatz mit CCl_4 wäscht. Dies muß so lange durchgeführt werden, bis der nächste Zusatz von Reagens grün bleibt. Es ist zweckmäßig, in einer Vortitration den annähernden Verbrauch an Reagens festzustellen. 1 Mol I = 2 Mol Ag. Als Bezugslösung dient eine n/2500 $AgNO_3$-Lösung (1 cm³ = 43,2 γ Ag = 33,4 γ I). Die Ermittlung eines abzuziehenden Harnleerwertes ist zweckmäßig. In 1 Liter Normalharn wurde ein Leerwert, entsprechend 31 mg I, gefunden.

b) Prinzip: I wird aus dem Harn mit CH_2Cl_2 ausgeschüttelt und darin als Quecksilberverbindung niedergeschlagen. Als solche ist das wegen seiner Flüchtigkeit einem Kjeldahl-Verfahren nicht zugängliche I nunmehr dafür geeignet. Die CH_2Cl_2-Phase wird in einen Kjeldahl-Kolben übertragen und nach Ausfällen der Quecksilberverbindung durch Eindampfen zur Trockne gebracht.

Ausführung: 20 cm³ Harn werden 3mal mit je 10 cm³ CH_2Cl_2 ausgeschüttelt. Die Extrakte werden vereinigt, zentrifugiert und durch ein Faltenfilter in einen Kjeldahl-Kolben filtriert. Zu dem Filtrat werden 2 cm³ einer 1%igen Sublimatlösung gegeben und gut durchgeschüttelt. Nach etwa zweistündigem Stehen wird das CH_2Cl_2 im Wasserbad von 50° und unter Luftdurchleiten verdampft. Weiterverarbeitung nach Kjeldahl (1 cm³ n/100 Säure = 0,14 mg N = 1,67 mg I). Es ist die Ermittlung eines abzuziehenden Harnleerwertes erforderlich. 1 Liter Harn entspricht 2,5—5,0 mg Leerwertstickstoff.

Pharmakologische Wirkungen. LD 50 in g/kg in Gummisuspension per os. Ratte: 0,49, Kaninchen: 1,0, Hund: 0,19, Meerschweinchen: 0,25, Maus: 0,88. Der Tod erfolgt in tiefer Narkose ohne Krämpfe unter Temperatursenkung und Einschränkung der Atmung. LD 50 subcutan in Gummisuspension Ratte: 0,39 g/kg und intravenös als gesättigte wäßrige Lösung größer als 0,18 g/kg.

6 Ratten vertrugen 0,1 g/kg und Tag mit dem Futter gereicht durch 31 Tage ohne Störung des Allgemeinbefindens und der Nahrungsaufnahme. Die Gewichtszunahme während der Versuchszeit war durchschnittlich 63 g. Weißes und rotes Blutbild zeigten keine Veränderung. Im Harn fehlten pathologische Bestandteile. Leber und Nieren der nach Versuchsabschluß getöteten Tiere waren histologisch normal.

2 Hunde ertrugen tägliche Gaben von 0,016 g/kg in Tabletten durch 23 Wochen. Sie zeigten während der Versuchszeit eine Gewichtszunahme von 5,7 bzw. 13,3%. Eine Abnahme der roten Blutkörperchen bzw. des Hämoglobins war nicht zu beobachten. Heinzsche Innenkörperchen waren nicht nachweisbar, auch fand keine Abnahme der weißen Blutzellen statt. Eine vorübergehende Linksverschiebung dürfte auf einen leichten intercurrenten Infekt zu beziehen sein. Der Harn enthielt keine pathologischen Bestandteile.

10%ige Suspensionen in Gummi-arabicum-Lösung werden bei intramuskulärer Verabreichung in Mengen von 0,5, 0,5 bzw. 0,1 cm³ bei Hund, Kaninchen bzw. Ratte ohne Schmerzäußerung und lokale Reaktion vertragen. Auch bei intracutaner

Verabreichung von 0,1 cm³ dieser Suspensionen am Kaninchenohr und an der Bauchhaut des Meerschweinchens traten keine Reizerscheinungen auf. Instillation einer gesättigten Lösung in physiologischer NaCl-Lösung ins Kaninchenauge hatte keine Reizwirkung zur Folge. Dieselbe Lösung bewirkte an Kaninchenerythrocytenaufschwemmung weder Hämolyse noch Änderung der osmotischen Resistenz.

Nach peroraler Verabreichung von narkotischen Schwellendosen (in Gummisuspension) sind bei Ratten, Kaninchen und Hunden nach 10 min Erscheinungen zu beobachten, bei größeren Gaben nach 5 min. — In abgebundene Dünndarmschlingen des Hundes eingebrachtes *I* (0,1 g) läßt sich schon nach 30 min mit der Silberfällung im CH_2Cl_2-Extrakt des Darminhalts nicht mehr nachweisen. Auch das Verhältnis LD 50 p. os/subc. bei der Ratte (vgl. oben) spricht dafür, daß *I* vom Magen-Darm-Kanal rasch und nahezu vollständig resorbiert wird.

Hinsichtlich der Ausscheidung beim Menschen nach peroraler Eingabe von 0,4 g in Tabletten vergleiche nachstehende Tab. 1.

Tabelle 1.

Stdn. nach der Eingabe	Gesamtausscheidung in % d. Eingabe		
	1. Person	2. Person	
	als Silberkomplex bestimmt	als Silberkomplex bestimmt	durch N-Bestimmung i. d. Hg-Fällung bestimmt
8	7,0	2,9	2,0
16	11,6	5,0	3,9
24	21,4	6,6	5,0
32	—	8,25	6,9
48	29,0	10,1	8,9
72			9,7

Aus diesen orientierenden Versuchen ergibt sich, daß *I* nur zu einem kleinen Teil ($^1/_{10}$ bis $^1/_3$) unverändert ausgeschieden wird. Der größere Teil wird offensichtlich rasch im Stoffwechsel zerstört. Mit Rücksicht auf die Belastung der Versuche durch hohe Leerwerte bedürfen sie noch weiterer Ergänzung.

Ein Hund von 6,5 kg erhielt durch 17 Tage täglich 0,03 g pro kg per os in Gummisuspension und blieb dauernd erscheinungsfrei. Ein weiterer Hund von 8,8 kg erhielt die schon schlafmachende Gabe von 0,06 g/kg täglich durch 9 Tage ohne Erscheinungen von Gewöhnung und Kumulation. Dagegen scheint bei Ratten wiederholte Verabreichung per os eine Verstärkung der Wirkung zur Folge zu haben.

Die Wirkung von *I* hängt außerdem bei peroraler Darreichung sehr von der Verabreichungsform, Korngröße und dem Füllungszustand des Magens ab. So konnten wir bei weißen Mäusen mit derselben Dosis in verdünnterer wäßriger Lösung geringere Wirkungen erzielen als mit der konzentrierteren, und beim Hund rief eine beim nüchternen Tier schlafmachende Dosis bei vollem Magen nur Schläfrigkeit hervor.

Die Wirkung beginnt mit einem Stadium ausgesprochen ruhigen Verhaltens mit leichten Graden von Ataxie. Die Schwellendosen sind nach peroraler Verabreichung in Gummisuspension bei Kaninchen, Maus, Hund bzw. Meerschweinchen in g/kg: 0,12, 0,03, 0,03 bzw. 0,03. Nach größeren Gaben (0,18, 0,125, 0,06 bzw. 0,125) geht dieser Zustand bei den gleichen Tierarten in ein Stadium halber bis voller Seitenlage, verbunden mit leichten Paresen, jedoch mit anhaltender guter Erweckbarkeit über. Bei Gaben von 0,5, 0,25, 0,25 bzw. 0,25 g/kg wird rasch volle Seitenlage ausgelöst, in der auch starke schmerzhafte Reize höchstens noch geringe Abwehrbewegungen zur Folge haben. Der Tod tritt nach 1,0, 0,5, 0,25 bzw. 0,25 g/kg ein.

Frösche, die in einer Konzentration von 10^{-5} *I* in Froschringer sich aufhielten, zeigten keine Erscheinungen. Dagegen ertrugen sie bei der Einwirkung einer Konzentration von 10^{-3} Seitenlage und blieben auch nach dem Übertragen in Leitungswasser noch 2 Std reflexlos. Nach 16 Std waren sie normal.

In Selbstversuchen wirkten 400—500 mg *I* nach ½ Std deutlich schlafmachend, ohne Müdigkeitserscheinungen am nächsten Tage zu hinterlassen.

Zum Vergleich sei angeführt, daß δ-Äthinylcyclohexanol(1), 3-Methylpentin-(1)-ol(3) bzw. Carbaminsäureäthylester bei Kaninchen in Gaben von 0,5, 0,5 bzw. 1,0 g pro kg per os sedativ und in Dosen von 1,0, 0,5 bzw. 1,0 g schlafmachend wirken. 4 g je kg sind vom δ-Äthinylcyclohexanol(1) und 2 g per os vom Carbaminsäureäthylester tödlich.

In Versuchen mit peroraler Verabreichung von *I*-Suspensionen in hohen Gaben an 2 Kaninchen (2 g/kg), 3 Katzen (250 und 360 mg/kg) und 2 Hunden (250 und 360 mg/kg), denen kein anderes Narkoticum verabreicht worden war, wurde Blutdruck und Atmung blutig registriert. Bei allen Tieren tritt mit beginnender Narkose eine Temperatursenkung ein, die jedoch für sich allein nicht lebensbedrohlich ist. Die Atmung wurde bei allen Tieren — abgesehen von vorübergehenden gelegentlichen Beschleunigungen — zunehmend verlangsamt und verflacht. Der Blutdruck blieb beim Hund bis zum Tode unverändert, bei Katzen kam es nach vorübergehender Senkung sogar zum mäßigen Anstieg und nur beim Kaninchen wurden Blutdrucksenkungen bis auf 45 mm Hg beobachtet. Bei tödlich verlaufenden Narkosen ist der Atemstillstand die primäre Todesursache.

Aus diesen Versuchen ergibt sich für die Wirkung auf subcorticale Zentren eine Bevorzugung des Atemzentrums, in geringerem Grade der Wärmeregulation, und nur beim Kaninchen wird in höherem Maße das Vasomotorenzentrum angegriffen.

Zur Prüfung der analgetischen Wirkung wurde bei weißen Mäusen die „Schmerzreaktionszeit" ermittelt, die beim Aufsetzen auf eine

Kupferplatte von 65° C bis zum ersten Fluchtversuch verstreicht[2]. Nach subcutaner Verabreichung von 10, 70 und 100 mg/kg (die letzten beiden Dosen gingen mit Schlafwirkung einher) konnte keine Verlängerung der Schmerzreaktionszeit festgestellt werden; nach 5 mg/kg Morphin wurde die Schmerzreaktionszeit um mehr als 100% verlängert.

Je 10 Mäuse, die 24 Std bei einer Raumtemperatur von 22° nüchtern gehalten waren, wurden mit 5 cm³ Leitungswasser von 30° C je 100 g per os belastet und erhielten 2 Std nachher 0,05 bzw. 0,07 g *I* je 20 g in 1 cm³ Leitungswasser per os. Die Kontrollen erhielten 1 cm³ Leitungswasser; der anschließende Diureseverlauf und die -Ausbeute (Ausgedrückt in Prozent der Wasserbelastung) unterschieden sich nach Verabreichung von 0,05 bzw. 0,07 g/kg nicht von den bei analog behandelten Kontrollmäusen erzielten.

Eine weitere Gruppe von je 10 Mäusen, die nur am Vortag mit 0,5 cm³/20 g belastet und dann nüchtern gehalten war, erhielt 0,05 g/kg *I* in 0,5 cm³ Leitungswasser je 20 g per os und zeigte gegenüber Kontrolltieren eine geringfügige Diureseheminung während der Zeit der Schläfrigkeit, die in den folgenden 3 Std aufgeholt wurde, so daß die Diureseausbeute behandelter und unbehandelter Tiere übereinstimmte.

Bei Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte wurde nach peroraler Verabreichung von 2 g bzw. 0,25 g bzw. 0,25 g/kg mit beginnender Narkose Pupillenverengung beobachtet.

Nach diesen Versuchen ist die Beeinflussung vegetativer Zentren durch *I* in schlafmachenden und selbst narkotischen Gaben nicht allzu bedeutend. Einen näheren Einblick in die narkotische Wirkung des *I* im Vergleich mit der von Diäthylbarbitursäure (II) liefern Versuche über antagonistische Beeinflussung der Krampfwirkung verschiedener Krampfgifte durch Schutzdosen der beiden untersuchten Schlafmittel. Zu diesem Zweck wurden von *I* und *II* jeweils jene Dosen ermittelt, die

Tabelle 2. *Die prophylaktische Wirkung von Aethinylcyclohexylcarbaminsäureester (I) (2‰ Lösung) und Diäthylbarbitursaurem Natrium (II) (4‰ Lösung als Na-Salz) bei i. p. Verabreichung gegenüber Cardiazol-, Coramin-, Strychnin- und Nikotinkrämpfen nach i.v.-Verabreichung an der Ratte.*

Intervall zwischen Schutzdosis und Krampfdosis in min	E D 50 (mg/kg i. peritoneal) gegenüber							
	Cardiazol 45 mg/kg i. v.		Coramin 250 mg/kg i. v.		Strychninnitrat 70 γ/kg i. v.		Nicotintartrat 200 γ/kg i. v.	
	I	II	I	II	I	II	I	II
15	22,7	24,2	80,0	80,0	40,0	50,0	100,0	200,0
50	25,0	21,0	140,0	80,0	80,0	30,0	80,0	160,0

bei Verabreichung 15 bzw. 50 min vor der Testdosis (der bei 100% der Tiere gerade krampfmachenden Gabe) den Ausbruch der Krämpfe bei 50% der Tiere verhütete. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Daraus geht hervor, daß gegenüber Cardiazol, Coramin und Strychnin *I* in seiner Wirkung sich kaum von *II* unterscheidet, dagegen ist es

gegenüber Nicotin wirksamer. Entsprechend der Auffassung von Bovet u. Longo[1] wäre dies dahin zu deuten, daß *I* stärker an Mesencephalon und bulbären Zentren angreift als *II*, während der Einfluß auf höhere Zentren bei beiden Stoffen etwa gleich stark ist. Im curativen Versuch über die antagonistische Wirkung des Coffeins gegenüber *I* an der Ratte ergab sich, daß die Schlafwirkung von *I* durch nachträgliche Coffeingabe aufhebbar ist, und zwar betrug die bei 50% der Tiere erweckend wirkende Dosis 100 mg/kg Coffein pur. intravenös (nach 15 min verabreicht) gegenüber einer schlafmachenden Dosis von 72 mg/kg *I*.

Am isolierten Kaninchenohr, das mit gepufferter Ringer-Lösung p_H 7,2 nach Nichol[5] durchströmt wurde, erwies sich *I* in einer Konzentration von 10^{-3} gefäßerweiternd, während 10^{-4} wirkungslos blieb. Adrenalindurchströmung in einer Konzentration von 10^{-7}, die eine starke Gefäßkonstriktion zur Folge hatte, blieb in Anwesenheit von *I* 10^{-3} ohne Wirkung. Es hat demnach *I* in den angegebenen Konzentrationen, die bei Verabreichung am Ganztier nie erreicht werden, peripher gefäßerweiternde Wirkung.

Am isolierten Kaninchendarm rief *I* in Konzentrationen von 6×10^{-5} in Tyrode-Lösung Hemmung der Pendelbewegungen und auch Tonussenkung hervor. Am isolierten Meerschweinchendarm erzeugten Konzentrationen von 3×10^{-5} geringe Erregung, 6×10^{-5} Hemmung der Pendelbewegungen.

Die Peristaltik des isolierten Meerschweinchendünndarms nach Trendelenburg wird erst durch Konzentrationen von 5×10^{-5} — 10^{-4} gehemmt, Dolantin ist vergleichsweise in Konzentrationen von 10^{-6} noch stärker wirksam. Die fehlende analgetische Wirkung des *I* ließ unter Berücksichtigung der von Schaumann[7] gemachten Annahme, daß die für den Peristaltikreflex verantwortlichen synaptischen Verbindungen ähnliche Empfindlichkeit besitzen wie die in der Schmerzbahn gelegenen, dieses Resultat erwarten. In Konzentrationen von 3×10^{-5} wird der am Meerschweinchendünndarm durch Bariumchlorid (10^{-5}) hervorgerufene Krampf auf die Hälfte und in Konzentrationen von 10^{-4} völlig unterdrückt. *II* unterdrückt den Ba-Spasmus in Konzentrationen von 5×10^{-4} auf die Hälfte. In Konzentration von 5×10^{-4} wird der durch Lentin 10^{-8} hervorgerufene Spasmus auf $^1/_4$ und in Konzentrationen von 10^{-3} auf die Hälfte reduziert. *II* unterdrückt den Lentin-Spasmus in Konzentrationen von 10^{-3} auf die Hälfte. Es ist demnach *I* stärker spasmolytisch wirkend als *II*.

I bewirkt in Konzentrationen von 10^{-4} in Frosch-Ringer am Straub-Herz eine Abnahme der Hubhöhen bei unveränderter Frequenz. 10^{-3} führt in 1—1½ min zu diastolischem Ventrikelstillstand bei schlagendem Vorhof. Die Wirkung war reversibel und durch Atropin nicht beeinflußbar.

Zur Prüfung des Verhaltens gegenüber sensiblen Nervenenden wurde die anästhesierende Wirkung an der Kaninchencornea mit Novocain verglichen. (Freysche Reizborste, Durchbiegungsgewicht von 0,15 g, 100 Reize je 25 sec; Tab. 3.)

Tabelle 3. *Die lokalanästhetische Wirkung von Aethinylcyclohexylcarbaminsäureester an der Kaninchencornea.*

Zahl der Reize bis zum Lidschlag			
Aethinylcyclohexyl-carbaminsäureester 2×10^{-3}	Novocain-hydrochlorid 2×10^{-2}	2×10^{-3}	1×10^{-3}
38	84	—	—
24	—	39	—
32	—	—	21
24	—	64	—
28	—	—	25
26	—	—	27

Aus der Tabelle ergibt sich, daß *I* auf die sensiblen Nervenenden etwa halb so stark wie Novocain wirkt.

Am Nerv-Muskelpräparat (Frosch-Gastrognemicus) von mit *I* narkotisierten Tieren (percutan 10^{-3}) ergab die Prüfung der direkten und indirekten Erregbarkeit (Öffnungs-Induktionsschläge eines Schlitteninduktoriums), verglichen mit der unbehandelter Tiere, keine Abweichung.

Die Atmung* behindernde Grenzkonzentration von *I* (Rattenleberschnitte, Warburg-Apparatur, Krebs-Ringer 37,5° C, Versuchsdauer 90 min) beträgt 0,05—0,1‰. Die gärungshemmende Grenzkonzentration (Bäckerhefe, $^{m}/20$ KH_2PO_4 — $^{m}/18$ Glucose, 25° C, Versuchsdauer 90 min) beträgt 1,4—1,5‰.

Es werden einige chemische und pharmakologische Eigenschaften des Aethinylcyclohexylcarbaminsäureesters beschrieben. Wir halten auf Grund dieser Untersuchung die Substanz für ein brauchbares Schlafmittel.

Literatur.

[1] Bovet, D., a. V. G. Longo: J. of Pharmacol. **102**, 22 (1951). — [2] Herr, F., u. J. Perszász: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 289 (1950). — [3] Kochmann, M.: Handb. exper. Pharmakol. A. Heffter I, 453. — [4] Margolin, S., P. Perlman, F. Villani a. T. H. McGavack: Science (Lancaster, Pa.) **114**, 384 (1951). — [5] Nichol, J. T., a. A. C. Burton: Amer. J. Physiol. **162**, 280 (1950). — [6] Preston, L., P. Perlman a. C. Johnson: J. Amer. pharmaceut. Assoc. **41**, 13 (1952). — [7] Schaumann, O., M. Giovannini u. K. Jochum: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 460 (1952). — [8] Wilbrandt, R., A. Jaeger: Helvet. med. Acta **15**, 203 (1948).

Prof. Dr. Hedwig Langecker, Hauptlaboratorium der Schering A.G., Berlin-West.

* Nach Messungen von Dr. K. Winzer.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 138—147 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt.

Zum Einfluß biogener Stoffe auf die Darmmotilität*.

Von

WALTHER VOGT**.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 21. Februar 1953.)

Unter der Bezeichnung „Darmstoff" wurde erstmals 1948 eine enterogene Substanz beschrieben, die die Darmmotilität erregt und durch besondere Eigenschaften von Histamin und Cholin zu unterscheiden ist[13, 14]. So wirkt der Darmstoff auch unter Atropin und läßt sich bei neutraler und selbst saurer Reaktion aus wäßriger Lösung mit Butanol extrahieren (Verteilungskoeffizient $k = 5$ bis 6 im System n-Butanol/Wasser). Im Verlauf von Reinigungsversuchen zeigte sich, daß daneben noch ein weiterer Stoff in Darmextrakten auftritt, dessen darmerregende Wirkung ebenfalls atropinresistent ist, der sich aber zwischen Butanol und Wasser anders verteilt wie Darmstoff ($k = {}^1/_3$)[15]. Dieser „Substanz DS" genannte Stoff hat im Papierchromatogramm (mit sec. Butanol entwickelt) einen RF-Wert zwischen 0,2 und 0,4, während der Darmstoff einen solchen von etwa 0,9 hat. Substanz DS wirkt sehr stark auf das isolierte Froschrectum und den Rattendarm; der isolierte Kaninchendarm ist dagegen ziemlich unempfindlich, reagiert aber stark auf Darmstoff.

In Versuchen am Froschmagen und -rectum gelang der Nachweis, daß auf Vagusreizung vermehrt darmerregende Substanz ausgeschüttet wird, was für die Atropinresistenz der vagalen Darmerregung eine Erklärungsmöglichkeit bietet. Als Überträgerstoff wurde der damals allein bekannte Darmstoff angenommen[13, 14]. Die Auffindung der Substanz DS warf nun die Frage auf, welcher der beiden Stoffe physiologische Funktionen erfüllt oder ob beide daran beteiligt sind.

Für den Fall, daß einer dieser Stoffe Anteil an den natürlichen Darmbewegungen hat, war zu erwarten, daß er im Darm in überschwelliger Konzentration vorkommt, d. h. in einer höheren Konzentration als derjenigen, die bei Einwirkung von außen gerade darmerregend wirkt. Es wurde deshalb in der weiter unten genauer beschriebenen Versuchsanordnung die Konzentration der frei diffusiblen, also pharmakologisch

* Herrn Prof. Dr. OTTO LOEWI zum 80. Geburtstag gewidmet.

** Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

aktiven Substanzen im Darmgewebe bestimmt und zu der eben wirksamen Konzentration dieser Substanzen in Beziehung gesetzt. Außer Darmstoff und Substanz DS wurden auch Histamin und Cholin berücksichtigt. Von Histamin ist eine physiologische Rolle für die Darmbewegungen wohl nie behauptet worden und von Cholin bzw. Acetylcholin wird sie auf Grund der Arbeiten von Le Heux[11] sowie Feldberg und seinen Mitarbeitern[5, 6, 7] allgemein anerkannt. Da aber hier eine andere Methode angewandt wurde, bestimmte ich trotzdem diese beiden Substanzen mit.

Methodik.

a) Ausführung.

In Urethannarkose (1,3—1,5 g/kg) wurde Kaninchen die Bauchhöhle in der Mittellinie durch einen etwa 3 cm langen Schnitt eröffnet, einige Dünndarmschlingen vorsichtig hervorgezogen und das Tier dann in Bauchlage auf ein frei ausgespanntes gefenstertes Tuch gelegt. Die vorgelagerten Darmschlingen kamen dabei in ein durch die Tuchöffnung gestecktes Glasgefäß mit 250—300 cm³ körperwarmer Ringer-Lösung, in der sie frei und ohne Zerrung flottierten. Das Gefäß tauchte in einen Thermostaten. Um die Badelösung in Konvektion zu halten, perlte ein gelinder Luftstrom durch. Die Darmschlingen verweilten so bei wechselnd lebhafter Tätigkeit eine Stunde im Bad. Dann wurde das Bad abgenommen, sein Volumen gemessen, kurz aufgekocht und im Vakuum zur Trockne gebracht. In ihm wurde später der Gehalt an Cholin, Histamin, Darmstoff und Substanz DS biologisch bestimmt.

Zur Prüfung der Empfindlichkeit gegen die verschiedenen Stoffe wurde nach Abschluß der Dialyse von den zur Dialyse benutzten Darmschlingen ein Stück in der üblichen Magnusschen Anordnung verwandt. Acetylcholin- und Histaminschwellendosen wurden mit Reinsubstanzen ermittelt, die Empfindlichkeit gegenüber Darmstoff und Substanz DS mit Hilfe von Standardpräparaten, deren Herstellung weiter unten beschrieben ist. Als Einheit für Substanz DS (= DS-E) und für Darmstoff (= E-E) gelten 10 γ des entsprechenden Standardpräparates. Es wurden mit dem Faktor 2 steigende Dosen geprüft und die erste deutlich wirksame Dosis dieser Reihe als Schwellenkonzentration angesprochen. Zwischen dieser und der Hälfte dieser Konzentration liegende Werte wurden nicht untersucht, da sich wegen der etwas schwankenden und infolge der Geringfügigkeit schwer zu erkennenden Reaktion im Schwellengebiet doch keine größere Genauigkeit ergeben hätte.

Aufarbeitung der Dialysate. Nach dem bereits erwähnten Eindampfen zur Trockne erfolgte zweimalige Extraktion mit je 10 cm³ Methanol. Der erste Methanolextrakt wurde auf dem Wasserbad eingedampft, sein Rückstand mit dem zweiten Methanolauszug aufgenommen, von ungelöst bleibenden Salzen abgetrennt, die Salze mit 2 cm³ Methanol nachgewaschen und die Filtrate vereinigt. Die resultierende, 12 cm³ messende Lösung wurde zur Bestimmung von Cholin (2 cm³), Histamin (4 cm³) sowie Darmstoff und Substanz DS (6 cm³) aufgeteilt.

Cholinbestimmung. Nach Abdampfen des Methanols wurde nach Kahlson[10] mit Essigsäureanhydrid auf dem Wasserbad acetyliert, das überschüssige Anhydrid unter Zusatz von Alkohol verjagt und der Rückstand am rectus abdominis von Temporarien gegen Acetylcholin-Chlorid ausgewertet.

Histaminbestimmung. Der nach Abdampfen des Methanols verbleibende Rückstand wurde mit 15 cm³ 2 n HCl versetzt und 1½ Std unter Rückfluß gekocht.

Die Salzsäure wurde mit Hilfe von Alkohol abgedampft und der Rückstand am Meerschweinchen-Ileum unter Atropin 1:2 Mill. gegen Histamin-Dichlorhydrat ausgewertet.

Bestimmung von Darmstoff und Substanz DS. Diese beiden Stoffe wurden durch Gegenstromverteilung voneinander getrennt. Beim Schütteln mit gleichen Volumina Butanol und Wasser finden sich von der eingesetzten Menge an Substanz DS $^3/_4$ in der Wasserphase und $^1/_4$ im Butanol, vom Darmstoff etwa $^5/_6$ bis $^6/_7$ im Butanol. $^1/_6$ bis $^1/_7$ im Wasser*. Dieser Trenneffekt wurde dadurch verstärkt, daß der für die Bestimmung abgezweigte Extrakt nach Abdampfen des Methanols der „Quadratverteilung[1]" durch 4 Rohre zwischen je 10 cm³ Wasser und Butanol (miteinander gesättigt) unterworfen wurde. Die Abbildung zeigt schematisch das Verfahren. In den vereinigten 4 Wasserphasen finden sich dann — wie sich aus den Verteilungskoeffizienten berechnen läßt — rund 95% der vorhandenen Substanz DS, während die gesammelten Butanolphasen fast 100% des Darmstoffs enthalten. Mit dieser Methode ließ sich also eine praktisch vollkommene und verlustfreie Trennung der Extrakte in Substanz DS und Darmstoff erreichen. Nach Eindampfen der Fraktionen wurde der Rückstand der Butanolphasen mit Hilfe des Darmstoffstandards am isolierten Froschrectum unter Atropin 1:2 Mill. auf seinen Darmstoffgehalt ausgewertet. Der Rückstand der Wasserphasen wurde, ebenfalls am atropinisierten Froschrectum in Froschtyrode, mit dem DS-Standard verglichen. Trotz seiner langsamen und gelegentlich schwer zu beurteilenden Reaktion wurde als Testobjekt das Froschrectum gewählt, weil es auf Histamin und auch auf Stoffe, die an anderen Därmen hemmend wirken**, nicht reagiert.

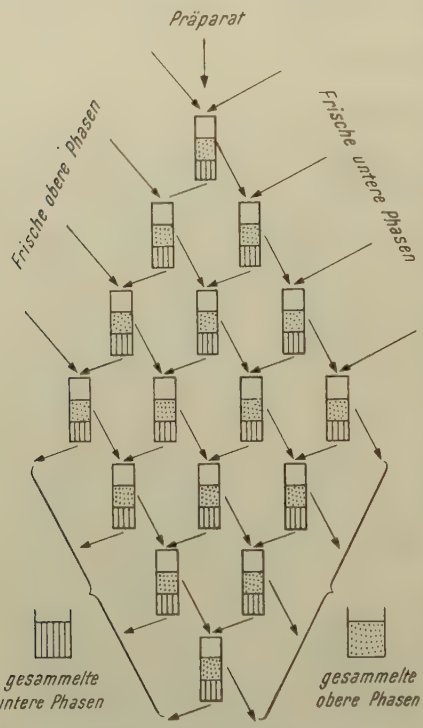


Abb. 1. Schematische Darstellung des Verfahrens der „Quadratverteilung" durch 4 Rohre. Jede Säule bedeutet einen Scheidetrichter. Nach jedesmaligem Schütteln und anschließendem Trennen der Phasen werden diese in den Pfeilrichtungen weitergeführt.

Aus den gefundenen Werten wurde dann die im ursprünglichen Dialysat vorhanden gewesene Konzentration der einzelnen Stoffe errechnet.

---

* Die Verteilungskoeffizienten (vgl. oben S. 140) wurden aus dem biologisch bestimmten Gehalt der einzelnen Rohre von Gegenstromverteilungen errechnet. Zur Berechnung dienten u. a. die von Lieberman[12] angegebenen Formeln und Tabellen.

** Diese Stoffe zählen wahrscheinlich zur Adenosingruppe, sie geben eine positive Orcinreaktion.

b) Kritisches zur Methode.

Die in den Dialysaten nachgewiesenen Stoffe gelangen aus dem Darmgewebe in das Bad durch Diffusion. Unter den gegebenen Bedingungen — Darm im natürlichen Verband mit dem Organismus, von dessen Blut durchströmt — bestehen zwei Diffusionsrichtungen: aus dem Darmgewebe einerseits ins Blut, andererseits in die umgebende RINGER-Lösung. Es ist zu erwarten, daß der Abstrom in die Gefäße rascher erfolgt, da fortwährend frisches Blut auf großer Oberfläche herangeführt wird. Trotzdem bleibt natürlich die Diffusionsrichtung Gewebe -> Badeflüssigkeit bestehen. Es wird schließlich ein Zeitpunkt erreicht werden, in dem die Badelösung eine ebenso hohe Stoffkonzentration hat wie das Darmgewebe selbst. Da alle hier untersuchten darmerregenden Stoffe leicht diffundieren und schon nach Minuten im Dialysat nachweisbar sind, schien eine Stunde Dialysedauer ausreichend. Zu lange sollte die Dialyse wegen der Möglichkeit von Darmschädigungen nicht dauern.

Die Konzentration in den Dialysaten ist sicher nicht höher als die im Gewebe laufend aufrecht erhaltene. Denn die Diffusion in die Außenflüssigkeit strebt dem Konzentrationsausgleich zu und hört mit dessen Erreichen auf. Wir können also aus den gefundenen Werten mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit schließen, daß mindestens solche Konzentrationen darmerregender Stoffe auch im lebenden Darm bestehen. (Dialyseversuche mit isolierten Därmen würden diesen Schluß nicht erlauben, da hier infolge der fehlenden Blutdurchströmung eine unnatürliche Akkumulation auftreten könnte.)

Ältere Versuche zum Nachweis von Acetylcholin im Darmvenenblut mußten bekanntlich offenlassen, wieweit das Acetylcholin aus der Schleimhaut oder aus der Muscularis stammte[5, 6, 7]. Bei der hier angewandten Methode läßt sich folgern, daß die gefundenen Stoffkonzentrationen in dem Teil der Darmwand, der uns interessiert — in der Muskelschicht — vorhanden sind. Selbst wenn die Stoffe in der Schleimhaut freigeworden sein sollten, können sie nur durch die Muscularis in die Badeflüssigkeit gelangen, müssen also in der gefundenen Konzentration auch die Muskulatur umspülen. Wenn diese Konzentration nun höher liegt als die für eine Erregung des Darms notwendige (Schwellenkonzentration), dann steht der Darm unter dem Einfluß des betreffenden Stoffs; was wir an „spontaner" Aktivität beobachten, ist also unter anderem die pharmakologische Wirkung dieses Stoffs. Ist umgekehrt die gefundene Konzentration niedriger als die Schwelle, dann läßt sich ein physiologischer Einfluß des Stoffs damit allein noch nicht ausschließen. Die Substanz könnte schnell abgebaut werden, im Verhältnis zur Dialysezeit zu langsam diffundieren oder an räumlich im Gewebe einen relativ geringen Platz einnehmenden „Wirkungsorten" in höherer, wirksamer Konzentration gebildet werden und erst bei der gleichmäßigen Verteilung im Gesamtgewebe auf unterschwellige Werte verdünnt werden.

c) Darstellung der Standardpräparate.

Darmstoff. Froschdärme und -mägen wurden zweimal mit je 10 cm³ H_2O pro Magendarmtrakt 1 Std lang bei Zimmertemperatur extrahiert. Ein Sammelextrakt von 24 Därmen wurde im Vakuum auf rund 10 cm³ konzentriert, zentrifugiert und mit 10 cm³ n-Butanol ausgeschüttelt. Die schwach gelbe, klare Butanollösung wurde nach Abzweigen einer kleinen Probe zur Trockne gebracht. Sie hinterließ 34 mg Substanz, die zusammen mit 500 mg NaCl in wenig Wasser gelöst und wieder getrocknet wurde. 10 γ dieses zu homogenem Pulver verriebenen Präparates wurden als eine Darmstoffeinheit (E-E) bezeichnet. Mit der abgezweigten Probe wurde eine papierchromatographische Reinheitskontrolle vorgenommen. Histamin- oder Substanz DS-Wirkung wurden in dem Präparat nicht gefunden.

Substanz DS. Als Ausgangsmaterial diente die aus einer Aufschwemmung von geschabtem Darmgewebe in Wasser bestehende Brühe, die beim „Schleißen" der Rinderdärme (für die Wursthautgewinnung) abfällt. Diese wurde 10 min gekocht und von den koagulierten Gewebsteilen dekantiert. 3200 cm³ Kochbrühe wurden im Vakuum auf 400 cm³ eingeengt, 800 cm³ Methanol zugesetzt, die aufgetretene Fällung nach 24 Std abzentrifugiert und mit wenig 70%igen Methanol gewaschen. Die vereinigten Lösungen wurden im Vakuum zur Sirupdicke konzentriert, dann mit 400 cm³ Methanol durchgerührt. Die dabei aufgetretene Fällung wurde wieder abgetrennt, mit Methanol gewaschen und verworfen. Aus den vereinigten Flüssigkeiten wurde das Methanol abgedampft, der Rückstand in etwa 100 cm³ Wasser aufgenommen und mit Äther ausgeschüttelt. Die wäßrige Lösung wurde darauf der Quadratverteilung durch 4 Rohre zwischen je 200 cm³ Wasser und Butanol unterworfen. Die Wasserphasen dieser Verteilung wurden zusammen auf 120 cm³ eingeengt. 60 cm³ davon passierten eine Aluminiumoxydsäule (32 mm ⌀, 16 cm hoch). Nachwaschen mit Wasser. Die wirksame Substanz war in den ersten 150 cm³ Durchlauf praktisch vollkommen enthalten. 120 cm³ des Durchlaufs wurden auf 50 cm³ konzentriert, mit HCl auf p_H 3 gebracht und durch 9 Rohre zwischen je 50 cm³ Wasser und 150 cm³ Butanol verteilt (mobile Phase: Wasserschicht). Die Hauptwirksamkeit fand sich in den mittleren Rohren. Die Lösungen in den Rohren 0, 1 und 7—9 wurden verworfen, das übrige zusammengegossen und auf 5 cm³ konzentriert. Dabei ausgefallene Stoffe wurden abgetrennt und der Extrakt (p_H 3,5) 24fach zwischen je 5 cm³ Wasser und 15 cm³ Butanol verteilt. Wieder war das Maximum der biologischen Wirkung in der Mitte der Verteilungsreihe. Die Inhalte der Rohre 9—13 und die Butanolphasen von 14 und 15 wurden zusammen im Vakuum eingedampft, in wenig Wasser aufgenommen, unlöslicher Rückstand abgetrennt und die Lösung mit 1 g NaCl zusammen zur Trockne gebracht. Es blieben 1350 mg Substanz zurück — entsprechend 350 mg Extraktivstoff — von denen 10 γ als eine DS-Einheit (DS-E) galten.

Histamin und Cholin kommen bei den Gegenstromverteilungen ganz auf die Seite der letzten Rohre (20—24), während Darmstoff, soweit er nicht schon vorher abgetrennt war, sich in den ersten Rohren (0—3) findet. Dementsprechend wurde bei papierchromatographischen Kontrollen des DS-Standards auch kein Anzeichen für das Vorhandensein dieser Stoffe gefunden. Die mehrmalige Verteilung wurde vorgenommen, um das DS-Präparat von darmhemmenden Stoffen (Adenosingruppe?) zu befreien, die mit der erregenden Wirkung der Substanz DS am Kaninchendarm interferieren.

Ergebnisse.

Die in den Darmdialysaten vorhandene Konzentration und die Empfindlichkeit der Därme gegenüber den 4 in Frage stehenden Stoffen wurde an 6 Kaninchen und 1 Katze bestimmt. Die Ergebnisse sind aus der Tab. 1 ersichtlich.

Bildet man das Verhältnis der Konzentration im Dialysat zur Schwellenkonzentration (= b/a der Tab. 1), so ergeben sich die in Tab. 2 abgedruckten Werte.

Bei keinem der Versuche liegt für Histamin und Substanz DS der Quotient über 1, während er bei Darmstoff deutlich und noch viel mehr bei Acetylcholin den Wert 1 übersteigt. Das heißt, die Konzentration

des Histamins und der Substanz DS erreicht in den Dialysaten nicht die für eine Darmwirkung nötige Höhe. Darmstoff und Acetylcholin sind dagegen in überschwelligen Konzentrationen vorhanden.

Tabelle 1.

Versuchs-Nr. Tierart	Histamin $\times 10^{-6}$		Acetylcholin $\times 10^{-6}$		Darmstoff E-E/cm³		Substanz DS DS-E/cm³	
	a	b	a	b	a	b	a	b
1 Kaninchen	1/10	<1/200	1/1000	1/2	1	9	5	<0,9
2 Kaninchen	1/5	1/130	1/1000	1/4,4	0,7	7	5	0,3
3 Kaninchen	1/20	1/160	1/1000	1/7	0,5	2	1,5	0,2
4 Kaninchen	1/10	1/275	1/4000	1/7,5	0,5	4	2	0,1
5 Katze	1/200	1/800	1/5000	1/11	2,5	17	5	<0,1
6 Kaninchen	—	—	—	—	0,25	5,3	2,5	0,25
7 Kaninchen	—	—	—	—	0,25	1,4	2	0,2

a Empfindlichkeit des Darms gegenüber dem bezeichneten Stoff (Schwellenkonzentration).

b Konzentration des bezeichneten Stoffs im Darmdialysat.

Wo die Konzentrationen mit < angegeben sind, war keine Aktivität nachweisbar gewesen.

Tabelle 2. *Verhältnis der in den Dialysaten vorhandenen zur Schwellenkonzentration.*

Versuchs-Nr.	Histamin	Acetylcholin	Darmstoff	Substanz DS
1	<1/20	500/1	9/1	<1/5
2	1/26	230/1	10/1	1/17
3	1/8	140/1	4/1	1/7
4	1/28	530/1	8/1	1/20
5	1/4	450/1	7/1	<1/50
6	—	—	21/1	1/10
7	—	—	6/1	1/10

Besprechung der Ergebnisse.

Aus den Versuchen läßt sich folgern, daß der Darmstoff eine physiologische Erregung auf den Darm ausübt — wenn die als Schwelle ermittelte Konzentration tatsächlich der Schwelle entspricht. Das

erscheint nicht von vornherein selbstverständlich, wenn man berücksichtigt, daß die Bestimmung der Empfindlichkeit an einem Darm vorgenommen werden mußte, der ja schon von sich aus eine bestimmte Darmstoffkonzentration erzeugt hatte. Es ließe sich daher einwenden, daß die geringste dem Testdarm zugesetzte wirksame Darmstoffdosis (im weiteren als „experimentelle Schwelle" bezeichnet) nicht von sich aus, sondern erst zusammen mit der bereits vorhandenen endogenen Darmstoffmenge die „wahre" Schwellenkonzentration ergäbe. Die Konzentration des endogenen Darmstoffs wäre dann für sich allein ebenfalls unterschwellig und der Schluß auf die physiologische Rolle falsch. Es war nicht möglich, die Freisetzung von Darmstoff zu verhindern und die Empfindlichkeit an einem darmstofffreien Testdarm zu prüfen. Trotzdem läßt sich der Einwand gegen die Schwellenbestimmung entkräften auf Grund der in den Versuchen gewonnenen Daten, wie am Beispiel der Zahlen aus Versuch Nr. 1 (siehe Tab. 2) gezeigt werden soll.

Die experimentelle Schwelle betrug an diesem Darm 1 E-E/cm³, während der Darm und das umgebende Bad bereits 9 E-E/cm³ endogenen Darmstoff enthielten. Soll der gemachte Einwand gelten, so dürften erst diese beiden Mengen zusammen, entsprechend einer Konzentration von 10 E-E/cm³, die wahre Schwelle ausmachen. Nach mehrfachem Spülen des Testdarms nimmt die Menge des selbstproduzierten Darmstoffs erfahrungsgemäß deutlich ab, er wird ausgewaschen. Sinkt die Konzentration des endogenen Darmstoffs nur um $^1/_3$, d. h. in unserem Beispiel von 9 auf 6 E-E/cm³, dann müßte der zu einer Wirkung erforderliche Zusatz, die experimentelle Schwelle, nun 4 E-E/cm³ betragen, also auf das Vierfache steigen, um wieder auf die gleiche wahre Schwelle — 10 E-E/cm³ — zu kommen. Tatsächlich blieb aber in diesem Versuch die experimentelle Schwelle selbst nach 36maligem Spülen konstant.

In einem eigens dazu angestellten Versuch wurde an einem isolierten Kaninchendarm außer dem Verlauf der Schwellenempfindlichkeit auch die Abnahme des Darmstoffgehalts in der Badelösung verfolgt. Nach 20maligem Badwechsel war die Badkonzentration an Darmstoff um mehr als $^2/_3$ gesunken, die experimentelle Schwelle blieb trotzdem gleich, eher war der Darm etwas empfindlicher geworden.

Die Dosis-Wirkungsbeziehungen sprechen ebenfalls gegen die Annahme, daß endogene und zugeführte Darmstoffmenge erst zusammen die wahre Schwellenkonzentration ergeben. Die experimentelle Schwelle betrug in den beschriebenen Versuchen $^1/_4$ bis $^1/_{20}$ der endogenen Konzentration. Wird diese Dosis beispielsweise versechsfacht, dann entspräche das — wenn die wahre Schwelle erst durch die Summe von endogenem und zugesetztem Darmstoff erreicht würde — im günstigsten Fall einer Verdopplung der wahren Schwellenkonzentration, im ungünstigsten

sogar nur einer Steigerung um 23%*. Tatsächlich bewirkt eine solche sechsfache Dosis aber eine ganz erhebliche Erregung, die viel mehr dem Bild der Maximal- als dem der Schwellenwirkung ähnelt.

Der Einwand, daß bei der Empfindlichkeitsbestimmung nur die endogen vorhandene und die zugeführte „experimentelle" Schwellenkonzentration *zusammen* einen Effekt bewirken, erscheint damit hinfällig. Daraus erfolgt, daß die in den Dialysaten und damit indirekt auch im Darm nachgewiesene Darmstoffkonzentration überschwellig, also darmwirksam ist. Die als experimentelle Schwelle gefundenen geringstwirksamen Dosen verursachen *Zusatz*erregungen und liegen im Bereich der tatsächlichen Schwellenempfindlichkeit des Darms. Der Kaninchendarm steht also unter anderem unter einer durch Darmstoff hervorgerufenen dauernden Erregung, seine Tätigkeit ist teilweise durch Darmstoff bedingt. Damit wird für eine weitere Tierart und mit anderer Methodik bestätigt, was früher beim Frosch wahrscheinlich gemacht wurde, daß der Darmstoff eine physiologische Rolle für die Darmtätigkeit spielt. Ein Teil dessen, was Feldberg u. Solandt 1942 als „inherent properties" des Darmmuskels bezeichneten[8], ist offenbar Darmstoffwirkung.

Auf eine getrennte Bestimmung von Cholin und Acetylcholin in den Dialysaten mußte verzichtet werden. Ohne Esterasehemmstoffe wird das Acetylcholin zu schnell verseift, auf der anderen Seite war die Anwendung von z. B. Physostigmin wegen der Nebenwirkungen auf den Kreislauf, die letzten Endes auch am Darm wieder unnatürliche Verhältnisse geschaffen hätten, unerwünscht. Außerdem ist damit zu rechnen, daß unter Physostigmin im Darm Acetylcholinkonzentrationen entstehen, die normalerweise gar nicht erreicht werden. Das macht ja die Physostigminwirkung erst verständlich.

Aus diesen Gründen wurde auf einen Schutz vor Verseifung verzichtet und das gesamte freie Cholin als Acetylcholin bestimmt. Die gefundenen Werte ergaben in allen Dialysaten Acetylcholinkonzentrationen, die um 2 Zehnerpotenzen höher als die Schwellenkonzentration lagen. Es ist wohl nicht möglich, daß derartige, spastisch wirkende Konzentrationen wirklich im Darm zur Wirkung kommen. Beim mengenmäßig größten Teil der Cholinkörper muß es sich daher um unverestertes Cholin handeln. Angenommen, es handelt sich praktisch nur um Cholin, so kämen die nachgewiesenen Konzentrationen knapp an die Größenordnung der Wirkungsschwelle für Cholin heran.

---

* Günstigster Fall (Versuch Nr. 3): Experimentelle Schwelle = 0,5 E-E/cm³, vorhandene (endogene) Darmstoffkonzentration 2 E-E/cm³. „Wahre" Schwelle: 0,5 + 2 = 2,5 E-E/cm³. Die sechsfache experimentelle Schwellendosis (= 3 E-E/cm³) ergäbe mit dem endogenen Darmstoff zusammen dann 5 E-E/cm³, also nur eine Verdopplung der „wahren" Schwelle. Entsprechend im ungünstigsten Fall (Versuch Nr. 6): 0,25 E-E/cm³ (exp. Schw.) + 5,3 (endogen) = 5,55 E-E/cm³ („wahre" Schwelle). $6 \times 0{,}25 + 5{,}3 = 6{,}8$ E-E/cm³ = 23% mehr.

Nach Chang und Gaddum ist der Kaninchendarm gegen Cholin 1300mal weniger empfindlich als gegen Acetylcholin[4]. Danach würde die Wirkungsgrenze des Cholins in unseren Versuchen bei 1:800000 bis 1:3 Mill. liegen, während die in den Dialysaten gefundenen Konzentrationen 1:2 Mill. bis 1:7,5 Mill. betrugen. Das spricht dafür, daß dem Cholin höchstens ein geringer Einfluß auf die Darmtätigkeit zukommt. Aus der bekannten hemmenden Atropinwirkung auf den Darm ergibt sich aber andererseits, daß ein physiologischer Einfluß muscarinartig wirkender Stoffe — also Cholin oder Acetylcholin — deutlich vorhanden ist. Feldberg und dessen Mitarbeiter wiesen Acetylcholin in Pfortader- und Dünndarmvenenblut in Konzentrationen von 1:20 Mill. bis 1:200 Mill. (unter Physostigmin) nach[5,6,7]. Es ist daher anzunehmen, daß in der Darmmuskulatur von der Cholingruppe wirkungsmäßig das Acetylcholin an erster Stelle steht, mengenmäßig dagegen, wie bereits gesagt, das Cholin.

Histamin und Substanz DS wurden in den Dialysaten nur in unterschwelligen Konzentrationen gefunden. Wie bereits erörtert, läßt dies Ergebnis den Schluß nicht zu, diese beiden Stoffe hätten keine Bedeutung für die normale Darmmotorik. Insbesondere ist beim Histamin damit zu rechnen, daß es im Gegensatz zu seiner Stabilität in vitro im Gewebe rasch abgebaut wird (Kahlson[2, 3]). Es könnten daher in den Dialysaten lediglich Reste von zunächst größeren freien Histaminmengen vorliegen. Jedoch bieten die Versuche auch keinen Anhalt für einen physiologischen Einfluß von Histamin auf die motorische Darmtätigkeit. Ivancevic u. Stern kamen mit anderer Methodik zu der gleichen Ansicht[9].

Zusammenfassung.

1. In Biodialysaten von Kaninchendärmen, die in natürlichem Verband mit dem Organismus blieben, wurde die Konzentration von Cholin, Histamin, Darmstoff und einem weiteren darmerregenden Stoff — Substanz DS — bestimmt.

2. Die Konzentration dieser Stoffe in den Dialysaten muß der im lebenden Darm entsprechen, sie kann im Gewebe allenfalls höher, aber nicht tiefer liegen.

3. Darmstoff ist im Darmgewebe in Konzentrationen vorhanden, die die Wirkungsschwelle deutlich überschreiten. Mithin steht der Darm natürlicherweise unter dem Dauereinfluß von Darmstoff. Von der Cholingruppe übt vor allem Acetylcholin eine Erregung aus. Cholin tritt wirkungsmäßig zurück, seine Gewebskonzentration liegt aber offenbar höher als die des Acetylcholins.

4. Ein Anhalt für einen natürlichen Einfluß biogenen Histamins oder von Substanz DS auf die Darmtätigkeit wurde nicht gefunden.

5. Die Darstellung von Standardpräparaten für Darmstoff und Substanz DS wird beschrieben.

Literatur.

[1] Bush u. Densen: Analyt. Chemistry **20**, 121 (1948). — [2] Carlsten, Kahlson u. Wicksell: Acta physiol. Scand. **17**, 370 (1949). — [3] Carlsten: Acta physiol. Scand. **20**, Suppl. **70**, 5. — [4] Chang u. Gaddum: J. of Physiol. **79**, 255 (1933). — [5] Dale u. Feldberg: J. of Physiol. **81**, 320 (1934). — [6] Donomae: Pflügers Arch. **234**, 318 (1934). — [7] Feldberg u. Rosenfeld: Pflügers Arch. **232**, 212 (1933). — [8] Feldberg u. Solandt: J. of Physiol. **101**, 137 (1942). — [9] Ivancevic u. Stern: Arch. internat. Pharmacodynamie **78**, 225 (1949). — [10] Kahlson: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **169**, 34 (1932). — [11] Le Heux: Pflügers Arch. **173**, 8 (1918). — [12] Lieberman: J. of Biol. Chem. **173**, 63 (1948). — [13] Vogt: Verh. dtsch. pharmak. Ges. 1948 [Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **208**, 221 (1949)]. — [14] Vogt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 1 (1949). — [15] Vogt: Verh. dtsch. pharmak. Ges. 1951 [Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 203 (1952)].

Dr. Walther Vogt, Pharmakol. Institut d. Universität Frankfurt.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 148—155 (1953).

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Graz.

Der fermentative Abbau der Erregungssubstanz der sensiblen Nerven, seine p_H-Abhängigkeit und seine Hemmung durch zentral erregende Stoffe*.

Von
KARL UMRATH.

(Eingegangen am 16. Februar 1953.)

Einleitung.

Für die sensiblen Nerven der Wirbeltiere haben HELLAUER u. UMRATH[7] gezeigt, daß sie eine Erregungssubstanz haben, die sich am denervierten Kaninchenohr durch eine Rötung nachweisen läßt, die auf Capillarerweiterung beruht. So wie das Acetylcholin der cholinergen Nerven durch Cholinesterase abgebaut wird, so wird die Erregungssubstanz der sensiblen Neurone durch ein Ferment abgebaut, das UMRATH u. HELLAUER[11] in höchster Konzentration in sensiblen Nerven und in etwas geringerer in von diesen innervierten cholinergen Neuronen nachgewiesen haben. So wie sich der fermentative Acetylcholinabbau durch Eserin und ähnlich wirkende Gifte hemmen läßt, so läßt sich, wie HELLAUER u. UMRATH[8] gefunden haben, der fermentative Abbau der Erregungssubstanz der sensiblen Neurone durch die Krampfgifte Strychnin, Pikrotoxin, Brucin und Cardiazol hemmen. Krämpfe entstehen offenbar dann, wenn sich im Zentralnervensystem die Erregungssubstanz der sensiblen Neurone anhäuft, meistens infolge einer Hemmung ihres fermentativen Abbaues. Ich habe es unternommen, den fermentativen Abbau der Erregungssubstanz der sensiblen Neurone, der offenbar im Zentralnervensystem eine wichtige Rolle spielt, noch näher zu untersuchen. Ich habe dabei 1. orientierende Versuche über seine p_H-Abhängigkeit angestellt und 2. die Wirkung derjenigen Stoffe untersucht, die man oft als zentral erregend bezeichnet.

Die zentral erregenden Stoffe gehören eigentlich zu den Krampfgiften, was auch die vergleichende Physiologie zeigt. Schon durch eine Untersuchung von FLOREY[3] wissen wir, daß zwar eine große Gruppe von Tieren, die Deuterostomier, dieselben Krampfgifte haben wie die auch in diese Gruppe gehörigen Wirbeltiere, daß aber die verschiedenen Gruppen der Protostomier sich abweichend und unter einander verschieden verhalten. Eine Untersuchung, die Frl. STIX im hiesigen Zoologischen Institut ausführt, zeigt, daß bei jeder bisher untersuchten Gruppe

* Diese Arbeit ist OTTO LOEWI zum 80. Geburtstag gewidmet.

der Protostomier einige der an Wirbeltieren wirksamen Krampfgifte Krämpfe auslösen, wobei mitunter einzelne Stoffe sehr stark wirken, die bei Wirbeltieren nur sehr schwach wirksam sind. In einzelnen Fällen wirkt auch Eserin als Krampfgift, bei Anneliden, wie ich gezeigt habe, stärker als Strychnin, Brucin, Cardiazol und Coffein.

Nach all dem glaube ich, daß die Erregungssubstanzen der verschiedenen Gruppen der Protostomier und die der Deuterostomier zwar voneinander verschieden, aber doch untereinander chemisch ähnlich sind und daß sie auch eine gewisse chemische Ähnlichkeit mit dem Acetylcholin haben, denn das Eserin ist als starke Anticholinesterase bekannt und viele Krampfgifte der Wirbeltiere hemmen, wie die Tabelle zeigt, auch die Cholinesterase.

Die p_H*-Abhängigkeit des fermentativen Abbaues der Erregungssubstanz der sensiblen Nerven.*

Ich habe Extrakte aus dorsalen Rückenmarkswurzeln vom Rind hergestellt, so wie Hellauer und Umrath[7] es beschrieben haben, d. h. ich habe die dorsalen Rückenmarkswurzeln in der dreifachen Gewichtsmenge einer Lösung von 0,65% NaCl und 0,01% $CaCl_2$ gekocht und den Extrakt nach etwa 2 Std dekantiert. Teile solcher Extrakte wurden durch Zugabe kleiner Mengen 0,5 n HCl oder 0,5 n NaOH, mitunter auch durch Zugabe von Na_2CO_3, auf verschiedenen p_H gebracht und dieser mit der Glaselektrode gemessen. Die Proben wurden bei 100° C sterilisiert. Darauf habe ich als Fermentträger einen rohen, sterilen Extrakt aus dorsalen Rückenmarkswurzeln vom Rind in einer solchen Konzentration und Menge zugesetzt, daß die Verdünnung schließlich 1:200 bis 1:400 war, was in einem Thermostaten bei 33° C in 15—18 Std bei normalem p_H einen praktisch vollkommenen Abbau ergab. Die Unterbrechung der Fermentwirkung erfolgte durch Erwärmen auf 100° C. Vor dem Test wurden alle Lösungen neutralisiert.

Es zeigte sich, daß Extrakte ohne Säure- oder Laugenzusatz ursprünglich einen p_H von 6,8—7,1 hatten, der während des Abbaues auf 5,6—6,0 sank. Extrakte, die durch Säurezusatz auf p_H 4,9 bzw. 5,6 gebracht worden waren, hatten nach dem Abbau p_H 5,2 bzw. 5,4. Extrakte, die duch Zusatz von Natronlauge auf p_H 8,3 gebracht worden waren, hatten nach dem Abbau p_H. 6,4 Es scheint demnach beim Abbau ein System zu entstehen, das bei p_H 5,4 stark gepuffert ist.

Zum Test wurden die Ohren von Kaninchen verwendet, aus deren Nervus auricularis magnus mindestens eine Woche vorher ein etwa ½ cm langes Stück entfernt worden war. Sollten die Kaninchen länger als drei Wochen verwendet werden, so wurde durch eine zweite Operation etwas weiter proximal ein ebensolches Stück des Nerven entfernt; die Kaninchen können dann weitere vier Wochen verwendet werden. Jedes Kaninchen wurde höchstens einmal in der Woche verwendet. Zu vergleichende Lösungen wurden subcutan in korrespondierende Stellen der beiden Ohren eines Kaninchens, ungefähr in ihrer Längsachse injiziert, oft im oberen und im unteren Teil der Ohren mit Vertauschung der Seiten. Alle Vergleiche wurden an mehreren Kaninchen durchgeführt.

In einem Extrakt mit p_H 9,3 oder 8,8 trat kein erkennbarer Abbau mehr ein. In Extrakten mit p_H 8,2—8,4 war der Abbau wesentlich

geringer als bei unbeeinflußtem p_H. In Extrakten mit p_H 7,8, 5,2 oder 4,9 war kein Unterschied des Abbaues gegen einen unbeeinflußten Extrakt von anfänglichem p_H 6,8 zu erkennen. In einem Extrakt mit p_H 4,6 fiel das Eiweiß aus, und es erfolgte kein Abbau.

Bemerkenswert erscheint mir die Hemmung des fermentativen Abbaues der Erregungssubstanz der sensiblen Neurone bei p_H-Werten über 8. Vielleicht tritt sie schon bei niedrigeren p_H-Werten (etwas über 7) ein, denn ein Extrakt mit einem Anfangs-p_H 8,3 hat zu Ende des gehemmten Abbaues nur etwa p_H 6,4. Die von Hellauer[6] entdeckte, *nicht* fermentative Zerstörung der Erregungssubstanz der sensiblen Nerven durch alkalische Reaktion ist, wie mir einige Versuche zeigten, bei halbstündigem Erhitzen auf 100° C erst bei p_H 9,5 und darüber merklich. Es ist also die Erregungssubstanz der sensiblen Nerven bei p_H 8 — 9 sehr stabil.

In dieser Beziehung verhält sich das Acetylcholin anders. Nach Glick[5] wirkt die Cholinesterase bei p_H 8,5 optimal und die nicht fermentative Hydrolyse nimmt im alkalischen Bereich stark zu. Innerhalb des physiologischen Bereiches nimmt die Stabilität des Acetylcholins daher mit sinkendem p_H zu. Es könnten so bei saurer Reaktion die cholinergen Übertragungen wirksamer werden und Gesell, Brassfield und Hamilton[4] bringen hiermit die gesteigerte Atmung bei saurer Reaktion des Blutes in Zusammenhang. Umgekehrt könnten bei alkalischer Reaktion die Übertragungen von sensiblen Neuronen wirksamer werden. Ich halte es für möglich, daß die Krampfanfälle, die man bei Epileptikern mitunter durch Hyperventilation und durch die so bedingte Alkalose auslösen kann, durch eine Verlangsamung des fermentativen Abbaues der Erregungssubstanz der sensiblen Neurone bedingt sind, so wie ja Krampfgifte, die diesen fermentativen Abbau hemmen, lokal auf die Großhirnrinde aufgebracht, ähnliche Krampfanfälle auslösen.

Die Hemmung des fermentativen Abbaues der Erregungssubstanz der sensiblen Nerven durch zentral erregende Stoffe.

Als ersten Stoff habe ich Coffein untersucht. Zunächst habe ich Coffeinum-natrio-benzoicum verwendet. Dieses reagierte schwach alkalisch, doch so schwach, daß ich nicht glaube, daß die p_H-Steigerung den fermentativen Abbau gehemmt hat. Zur Sicherheit habe ich aber bei den entscheidenden Versuchen Coffeinum-natrio-salicilicum verwendet, das schwach sauer reagiert. Verglichen wurden Extrakte aus dorsalen Rückenmarkswurzeln, denen Coffein und Fermentextrakt gleichzeitig vor der Inkubation oder getrennt vor und nach der Inkubation zugesetzt worden waren. In der Verdünnung 1:50 hemmte Coffein-Natrium-salicylat den fermentativen Abbau vollständig, in der Verdünnung 1:100 noch weitgehend (bei genauer Prüfung schien die rötende Wirkung am Ohr aber etwas geringer als bei dem nicht abgebauten Extrakt gleicher Zusammensetzung). In der Verdünnung 1:200 war die Hemmung noch deutlich nachweisbar, aber gering. Wahrscheinlich liegt also die Grenze für die vollständige Hemmung durch Coffein-Natrium-Salicylat bei der Verdünnung 1:75.

Atropinsulfat hatte in der Verdünnung 1:50 nur einen sehr geringen Effekt. Nur in 4 Fällen von 9 war der Extrakt, auf den das Ferment bei Atropingegenwart eingewirkt hatte, wirksamer (stärkere Rötung am denervierten Kaninchenohr). Ein umgekehrtes Verhalten kam nicht vor. Bei Atropinsulfat 1:25 jedoch war die Fermenthemmung deutlich, wenn sie auch bei dieser Atropinkonzentration noch keine vollkommene gewesen sein dürfte.

Santonin in Form von Natrium santoninicum bewirkte in der Verdünnung 1:50 noch keine Hemmung, in der Verdünnung 1:20 war sie jedoch immer erkennbar, die rötende Wirkung am Kaninchenohr also stärker als bei fermentativem Abbau mit nachträglichem Santoninzusatz. Bei der Verdünnung 1:10 war die Fermenthemmung stark und scheinbar vollkommen.

Bei der Untersuchung der stärkeren Krampfgifte hatten Hellauer u. Umrath[8] die Verdünnung, die in vitro den fermentativen Abbau der Erregungssubstanz der sensiblen Neurone vollkommen hemmt, mit der Verdünnung verglichen, die beim Frosch in vivo Krämpfe auslöst. Ich habe jetzt für Esculenten ähnlicher Größe, wie wir sie damals verwendet haben, die Krampfdosis von Coffeinum-natrio-salicylium zu 3 mg bestimmt. Die Frösche hatten auch eine ähnliche Strychninempfindlichkeit wie die damals von uns verwendeten. Mit Atropinsulfat konnte ich auch mit 4 und 6 mg pro Frosch keine echten Krämpfe auslösen, sondern höchstens manchmal krampfartige Zuckungen, wenn der Frosch berührt oder umgedreht wurde. Nach Cushny[2] bedingen 0,01—0,02 g Atropin subcutan beim Frosch nach 2—3 Tagen eine Steigerung der Reflexerregbarkeit und später strychninähnliche Krämpfe, denen meist eine Erholung folgt. Da Hellauer und Umrath kleine Frösche verwendet hatten, habe ich vergleichsweise die Krampfdosis von Atropin mit 10 mg angenommen. Für Natrium santoninicum habe ich nach der Untersuchung von Binz[1] 100 mg als Krampfdosis für kleine Frösche angenommen.

In der Tabelle sind die Angaben für die stärkeren Krampfgifte aus der Arbeit von Hellauer u. Umrath[8] übernommen. Bei Coffein, Atropin und Santonin sind für die krampfauslösenden Dosen beim Frosch die eben besprochenen Werte eingesetzt.

Aus diesen krampfauslösenden Dosen ist ausgerechnet, welche Verdünnungen diese in 4% des Körpervolumens eines 5 g schweren Frosches ergeben würden. 4% wurden schon von Hellauer u. Umrath[8] nur deswegen gewählt, weil die Verhältniszahlen so denjenigen sehr ähnlich werden, die in vitro eine vollständige Hemmung des fermentativen Abbaues der Erregungssubstanz der sensiblen Neurone ergeben. Tatsächlich wird die Verteilung der Krampfgifte im Froschkörper eine ungleichmäßige sein, aber die Gewebe, die viel von ihnen enthalten, werden doch mehr ausmachen als 4%. Dafür wird aber bei der Krampfauslösung die Fermenthemmung noch lange keine vollständige sein.

Bei Vergleich dieser Zahlen mit den Verdünnungen, in denen die geprüften Gifte den fermentativen Abbau der Erregungssubstanz der sensiblen Neurone praktisch vollkommen hemmen, sieht man sehr gut und eindrucksvoll, daß die Krampfauslösung der Fermenthemmung durchaus parallel geht.

Im letzten Stab der Tabelle ist schließlich die Verdünnung verzeichnet, in der der fermentative Abbau des Acetylcholins, d. h. die Cholinesterase praktisch vollständig gehemmt wird.

Tabelle

Pharmakon	Krampfdosis mg pro Frosch von 5 g	Krampfdosis des Frosches in 4% seines Körpervolumens	Verdünnung für noch vollkommene Hemmung des fermentativen Abbaues der Erregungssubstanz d. sensiblen Nerven	Verdünnung für noch vollkommene Hemmung des fermentativen Abbaues d. Acetylcholins
Strychnin	0,02	1:10000	1:10000	1: 3000
Pikrotoxin	0,05	1: 4000	1: 2000	1: << 300
Brucin	0,4	1: 500	1: 1000	1: 300
Cardiazol	1	1: 200	1: 250	1: 200
Coffein	3	1: 70	1: 75	1: 800
Atropin	10	1: 20	1: < 25	1: < 20
Santonin	100	1: 2	1: 10	1: << 50

Die Daten für Strychnin, Pikrotoxin und Brucin sind aus der Arbeit von Hellauer und Umrath[8] entnommen, die für Cardiazol ist nach einer neueren Arbeit von mir[10] berichtigt und dieser Arbeit ist auch die Angabe für Coffein entnommen. Für Atropinsulfat habe ich durch Versuche, die am Rückenmuskel des Egels Haemopis sanguisuga getestet wurden, festgestellt, daß ein Abbau auf etwa 1% des anfänglich eingebrachten Acetylcholins folgendermaßen gehemmt wird: Atropinsulfat 1:100 eben merklich, 1:60 schon deutlich stärker, 1:20 weitgehend aber noch nicht vollständig (etwa 30% des Acetylcholins bleiben erhalten). Die Cholinesterasehemmung durch Natrium santoninicum habe ich am Froschherzen und am Rückenmuskel des Egels getestet: Die Verdünnung 1:100 war unwirksam, 1:50 geringfügig hemmend.

Man sieht also aus der Tabelle, daß zwischen der Cholinesterasehemmung und der Krampfauslösung kein so enger Parallelismus besteht, wie zwischen der Hemmung des fermentativen Abbaues der Erregungssubstanz der sensiblen Neurone und der Krampfauslösung. Bei der Cholinesterasehemmung fallen vor allem das Pikrotoxin mit seiner geringen und das Coffein mit seiner hohen Cholinesterasehemmung aus der Reihe. Beide Fermente werden durch Cardiazol, Atropin und Santonin etwa gleich stark gehemmt, durch Strychnin und Brucin die Cholinesterase nur wenig schwächer, als das auf die Erregungssubstanz der sensiblen Neurone wirkende Ferment. Diese, bei vielen Stoffen ähnliche Wirkung auf die beiden Fermente spricht, wie schon erwähnt, dafür,

daß die Erregungssubstanz der sensiblen Neurone dem Acetylcholin irgendwie ähnlich ist.

Wenn nun die eben krampfauslösende Dosis eines Stoffes nur von der Stärke der Hemmung desjenigen Fermentes abhängt, das die Erregungssubstanz der sensiblen Neurone abbaut, so scheint doch das Ausmaß der gleichzeitigen Cholinesterasehemmung von Einfluß auf den Charakter der Krämpfe zu sein.

Schon Hellauer und Umrath haben gefunden, daß man die klonischen Pikrotoxinkrämpfe, bei denen besonders bei schwachen Dosen die krampfhaften Bewegungen den normalen ähnlich sind, durch einen geringen Eserinzusatz besonders den Cardiazol-, aber auch den Strychninkrämpfen ähnlicher machen kann, wobei das rasch aufeinanderfolgende Zurückschlagen der Hinterbeine, die Streckkrämpfe und das Anlegen der Vorderbeine an den Körper mehr in Erscheinung treten.

Ich habe jetzt mittelgroßen Esculenten 0,6 mg Pikotroxin allein oder zugleich mit 0,0008, sowie 0,02—0,08 mg Eserin injiziert. Die Frösche der ersten Gruppe (mit geringem Eserinzusatz) bekamen cardiozolartige Krämpfe, was die seinerzeitigen Befunde von Hellauer u. Umrath[8] bestätigt. Die Frösche der zweiten Gruppe (mit größerem Eserinzusatz), bekamen coffeinartige Krämpfe; ihre Glieder waren meist in gebeugtem Zustand steif, Streckkrämpfe waren seltener und bei Streckungen der Hintergelenke blieb das Fersengelenk meist gebeugt. Es scheint demnach tatsächlich die durch ein Krampfgift bedingte Cholinesterasehemmung für den Charakter der Krämpfe wesentlich zu sein; für die Krampfauslösung überhaupt kommt es allerdings fast nur auf die Hemmung des Fermentes an, das die Erregungssubstanz der sensiblen Neurone abbaut.

Manche Krampfgifte, wie besonders das Strychnin und das Cardiazol werden als zentral wirkende Kreislaufmittel angewandt. Sicher spielt dabei die Hemmung des fermentativen Abbaues der Erregungssubstanz der sensiblen Neurone die Hauptrolle, möglicherweise wird sie aber durch die Hemmung des Acetylcholinabbaues in den Vasomotorenzentren unterstützt.

Das Coffein ist ein sehr verbreitetes Genußmittel, das sich vor anderen durch seine Förderung der Tätigkeit nervöser Zentren, besonders des Großhirns, auszeichnet. Auch hierbei dürfte die Hemmung der Fermente eine Rolle spielen. Die zentrale Wirkung auf den Kreislauf ist beim Coffein weniger ausgeprägt als bei den oben genannten Stoffen.

Bei Atropinvergiftungen tritt die zentral erregende Wirkung in Erscheinung. Während bei den anderen besprochenen Stoffen die Fermenthemmungen bei Verdünnungen auftreten, die keine wesentlichen anderen Wirkungen im Nervensystem haben, hat das Atropin in ähnlicher Verdünnung noch eine Reihe anderer Wirkungen; es hemmt die muscarinartige Acetylcholinwirkung schon in außerordentlich hoher Verdünnung, aber in hoher Konzentration auch die nicotinartigen Acetylcholinwirkungen, wie z. B. am Rückenmuskel des Egels, *Haemopis sanguisuga*, ganz deutlich in der Verdünnung 1 : 1000. Nach einer Untersuchung von Umrath und

Müssbichler[12] hemmt Atropin auch die cholinergen Übertragungen von sekundären Sinneszellen auf sensible Nerven und von Hornhautepithelzellen auf sensible Nerven. Hier blockiert Atropin in der Verdünnung 1:100 weitgehend und in der Verdünnung 1:10000 eben noch merklich; bei diesen Acetylcholinwirkungen auf sensible Nerven ist keine stärker blockierende Substanz als Atropin bekannt.

Es gibt sogar einen Fall in dem das Atropin acetylcholinartig wirkt und zwar, wie Riedinger und Umrath[9] fanden, beim Farbwechsel der Fische und Amphibien. Es bewirkt im „physiologischen" Farbwechsel eine Expansion des Melanins und im „morphologischen" Farbwechsel eine Vermehrung der Zahl der Melanophoren. Auch quantitativ ist die Atropinwirkung hier der Acetylcholinwirkung vergleichbar. Eine Melaninexpansion in Schuppen von Macropoden war bis zu folgenden Verdünnungen noch zu beobachten: bei Acetylcholin bis $1:10^6$, bei Atropin bis $1:10^5$, ebenso bei Arecolin bis $1:10^5$ und bei Pilocarpin bis $1:10^3$. Die Acetylcholin- und die Arecolinwirkung wurden durch Atropin in höheren Verdünnungen blockiert oder abgeschwächt, und zwar noch in der Verdünnung $1:10^{10}$.

Fermenthemmungen durch Atropin machen sich erst bei höheren Konzentrationen geltend als viele der anderen Wirkungen. Sie sind daher an und für sich beim Atropin nicht auffällig. Vielleicht ist aber der Umstand bemerkenswert, daß fast dieselben Atropinverdünnungen zur Hemmung der Cholinesterase und zu der des Fermentes, das die Erregungssubstanz der sensiblen Neurone abbaut, ausreichen, wo doch die sonstigen Atropinwirkungen bis zu ganz verschieden hohen Verdünnungen reichen.

Zusammenfassung.

Der fermentative Abbau der Erregungssubstanz der sensiblen Nerven ist im alkalischen Gebiet gehemmt, von p_H 8 an deutlich und bei p_H 9 sehr weitgehend. Im sauren Gebiet trat eine Hemmung des Fermentes erst bei p_H-Werten unter 5, bei der Koagulation des Eiweißes auf.

Die untersuchten, zentral erregenden Stoffe, Santonin, Atropin und Coffein, schließen sich durchaus den früher untersuchten stärkeren Krampfgiften, Cardiazol, Brucin, Pikrotoxin und Strychnin an, indem die in vivo krampfauslösenden Dosen denjenigen parallel gehen, die in vitro den fermentativen Abbau der Erregungssubstanz der sensiblen Neurone hemmen.

Zwischen Krampfauslösung und Cholinesterasehemmung besteht kein so weitgehender Parallelismus; vor allem ist das Pikrotoxin ein starkes Krampfgift mit sehr geringer Cholinesterasehemmung und das Coffein ein sehr schwaches Krampfgift mit relativ starker Cholinesterasehemmung. Der gewisse Parallelismus in der Hemmung des fermentativen Abbaues des Acetylcholins und der Erregungssubstanz der sensiblen Neurone weist darauf hin, daß diese beiden wichtigsten Erregungssubstanzen im Zentralnervensystem einander chemisch ähnlich sind.

Ich danke der Rockefeller Foundation für ein Stipendium für eine technische Assistentin, wodurch auch diese Arbeit wesentlich gefördert worden ist.

Literatur.

[1] Binz, C.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **6**, 300 (1889). — [2] Cushny, A. R.: Die Atropingruppe. Handb. d. experm. Pharmakol. von A. Heffter, 2. Bd. 2. Hälfte S. 599. Berlin: Springer 1924. — [3] Florey, E.: Z. vergl. Physiol. **33**, 327 (1951). — [4] Gesell, R., H. Brassfield and M. A. Hamilton: Amer. J. Physiol. **136**, 604 (1924). — [5] Glick, D.: J. Gen. Physiol. **21**, 289 (1938). — [6] Hellauer, H. F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck) 1953. — [7] Hellauer, H. F., u. K. Umrath: Pflügers Arch. **249**, 619 (1948). — [8] Hellauer, H. F., u. K. Umrath: Z. Vitamin-, Hormon- Ferm.forsch., Wien **3**, 244 (1950). — [9] Reidinger, L., u. K. Umrath: Z. vergl. Physiol. **34**, 473 (1952). — [10] Umrath, K.: Z. vergl. Physiol. **34**, 93 (1952). — [11] Umrath, K., u. H. F. Hellauer: Pflügers Arch. **250**, 737 (1948). — [12] Umrath, K., u. H. Müssbichler: Z. Vitamin-, Hormon- Ferm.-forsch. **4**, 182 (1951).

Prof. Dr. Karl Umrath, Zoologisches Institut d. Universität Graz.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 156—159 (1953).

Instituto de Biologia y Medicina Experimental, Costa Rica 4185, Buenos Aires.

Adrenal Secretion of Adrenalin and Noradrenalin*.

By

B. A. Houssay and C. E. Rapela.

(Eingegangen am 27. Februar 1953.)

The adrenal venous blood has a hypertensive effect (Cibulsky, 1895; Langlois, 1897) which increases markedly by stimulation of the splanchnic nerves (Dreyer, 1898; Tscheboksaroff, 1910). — This action was attributed to the adrenalin, hormone secreted by the medulla of the adrenal gland. — From 1919 until now this secretion was studied in different conditions by one uf us (B. A. Houssay) and his collaborators: L. Cervera, A. P. Marconi, J. T. Lewis, E. A. Molinelli, A. D. Marenzi, R. Gerschman, E. Hug and C. E. Rapela. — A complete survey of the literature and his own experiments was published by Molinelli in 1926.

Recently, noradrenalin was also found in the adrenal gland (Holtz and col. 1948) and in the adrenal venous blood (Bülbring and Burn, 1949; West, 1950; Houssay and Rapela, 1952). — Noradrenalin is now identified with E sympathin and also considered as a second hormone of the adrenal medulla (von Euler, 1950).

We have studied the adrenal secretion of adrenalin and noradrenalin in different conditions: basal, section or stimulation of splanchnic nerves, asphyxia and nicotin injection.

Technics.

Dogs anesthetized with 33 mg/kg of nembutal intravenously, were used in all the experiments. — Artificial respiration was used. — The adrenal vein and the splanchnic nerve were prepared by lumbar extra peritoneal approach. — Heparin at the initial dose of 3 mg/kg and then 1 mg/kg every 20 min was given. — The lumbo-adrenal vein was cannulated with a polythene catheter and ligated between the adrenal gland and the vena cava. —

The adrenal venous blood was collected in glass cylinders kept in iced water; and plasma was obtained by centrifuging at 3000 r. p. m. during 30 min. —

The assys were carried out on the following biological test: a) blood pressure of the dog; b) isolated uterus of the non pregnant rat in dioestrus (de Jalon, Bayo and de Jalon, 1945). — The dogs were injected with atropine sulphate (2 mg/kg) and cocain clorhydrate (7 mg/kg i. m.), and their vagi nerves cut; in some cases the spinal cord was sectioned at the cervical level. — Plasma samples were tested finding the equieffective doses of adrenalin and noradrenalin in both preparations. — For the final calculations the formula applied by Bülbring (1949) was used. —

* It is a great pleasure for us to express our admiration and friendship to Professor Otto Loewi in occasion of his 80th birthday.

Blood samples were collected as follows: a) since the 2nd minute after the beginning of a 5 minutes-period of asphyxia, by clamping the trachea, up to 30 seconds after its end; b) during strong electrical stimulation by a Harvard inductorium applied during 30 seconds; c) after intravenous (jugular) injection of nicotine dissolved in 5—10 cc of saline solution, from the beginning of the injection until 2 min 30 sec after. —

Results.

In the basal adrenal venous blood, the average adrenalin proportion was 84% to 86% and noradrenalin 14% to 16%.

Asphyxia induced a marked increase up to 34 times the initial quantity of ergones, without any change in the proportion of adrenalin (86%) and noradrenalin (14%).

After splanchnic nerve section the total secretion of adrenalin plus noradrenalin fell to 3% of its previous initial value. — The proportion of adrenalin fell also from 84% (normal average) to 66%—69% (see chart).

The stimulation of the peripheral stump of the sectioned splanchnic nerve increased 41 times the initial quantity of total ergones (see chart). — The adrenalin proportion rose from 69% to 79% and this increase was of statistical significance.

Nicotin was injected in dogs with vagi and splanchnic nerves cut. — There was a definite increase of total ergones (44 to 138 times the initial quantity). — The proportion of adrenalin rose every time with the active doses of nicotin (0.5 to 1.5 mg, i.v., dogs of 12—20 kg). — From the initial value 66% it rose to 90%—94% of adrenalin (see chart).

With splanchnic nerves intact or cut the total amount of ergones was similar after injection of 1 mg of nicotine. — But the previous initial level being different the increase was 43 times with splanchnic nerve intact and 138 times with this nerve sectioned. — The proportion of adrenalin was also similar after the injection although the initial level was different.

Discussion.

Noradrenalin was found in the adrenal venous blood of the majority of dogs. — In all cases the proportion of adrenalin was larger than the proportion of noradrenalin.

The three types of stimuli applied provoked a marked increase of the secretion of both ergones, but the augmentation was different in relation with the stimuli used.

Section of splanchnic nerve produced a decrease of the total quantity of ergones, as it is well known, but also the proportion of adrenalin fell. The nerve stimulation increased the proportion of adrenalin. Both facts show that the nerve exerted a specific action on adrenalin secretion. — The mechanism through which this action is performed could be a

methylating effect of the nerve upon noradrenalin favoring its transformation to adrenalin (Bülbring, 1949).

Nicotin increased more the adrenalin than the noradrenalin secretion. — A similar effect was observed after splanchnic nerve section indicating it is due to a peripheral direct action of nicotin on the adrenal medulla.

Table. *Adrenalin and noradrenalin in the adrenal venous blood, anesthetized with nembutal and heparinized.*

Splanchnic nerves		n° of observations	Adrenalin + noradrenalin µg/kg/min	Percentage Increase	Adrenalin %
Intacts	Before	10	0,0127		86
	Asphyxia	6	0,4370	340	86
Intacts	Before	22	0,0319		84
Cut	Splanch. n. cut	17	0,0097		69
Cut	Splanch. n. stimulat	17	0,3896	410	79
Cut	Splanch. n. cut	23	0,0095		66
	0,25 mg nicotin	3	0,0109		79
	0,50 „ „	4	0,4370	460	91
	0,75 „ „	7	0,4208	440	90
	1,00 „ „	8	1,3164	1380	93
	1,50 „ „	6	1,1435	1200	94
Intacts	Splanch. n. intacts	22	0,0319		84
	1,00 mg nicotin	6	1,3738	430	95

— This action of nicotin seems specific, as 0.5 mg produced a similar increase of total ergones than the splanchnic nerve stimulation, but the proportion of adrenalin was very different.

These facts suggest the possible existance of different mechanism that could produce with preference the secretion of adrenalin or noradrenalin.

Conclusion.

1. The adrenal gland of the dog secretes adrenalin and noradrenalin to the blood, the first in larger proportion. — The average percentage was: adrenalin 84% to 86% and noradrenalin 14% to 16%.

2. Asphyxia increase 34 times (average) the basal secretion without change of the proportion of ergones.

3. Section of splanchnic nerve decreases 31 times (average) the initial value of total ergones. — The stimulation of the peripheral stump of this nerve increases markedly (average 41 times) the quantity of total

ergones. — The relative proportion of adrenalin fell after the nerve section (from 84% to 66%—69%) and rose after its stimulation 69% to 79%).

4. Nicotin increase the secretion of total ergones (average from 44 to 138 times). — The proportion of adrenalin rose very definitely (with splanchnic nerves cut from 66% to 90%—94%).

This investigation was supported in part by a research grant from the National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (USA). —

Bibliography.

Bülbring, E.: Brit. J. Pharmacol. **4**, 234 (1949). — Bülbring, E., u. J. H. Burn: Brit. J. Pharmacol. **4**, 202, 234 (1949). — Cybulski, N.: Bull. Acad. Sci. Cracovie, Classe Sc. nat. et nat. **82**, 95 (1895). — Arch. f. d. ges. Physiol. **64**, 97 (1896). — Wien. med. Wschr. **215**, 255 (1896). — Dreyer, G. P.: Amer. J. Physiol. **2**, 203 (1898). — Euler, U. S. von: Erg. Physiol. **46**, 279 (1950). — Holtz, P., H. Schümann, W. Langenbeck, H. Le Blanc: Naturwiss. **55**, 191 (1948). — Jalon, P. G. de, J. C. Bayo et M. G. Jalon: Farmacoterap. act., Madrid **2**, 313 (1945). — Langlois, J.: These Fac. Sci. de Paris, 1897. — Molinelli, E. A.: Tesis Fac. Ciencias Médicas, Bs. Aires (1926). — Rapela, C. E., and B. A. Houssay: Rev. Soc. argent. biol. **28**, 7 (1952); **28**, 209 (1952); **28**, 219 (1952). — Tschebok-saroff: Arch. Physiol. (Berlin) **137**, 59 (1910). — West, G. B.: Brit. J. Pharmacol. **5**, 542 (1950).

Dr. B. A. Houssay, Instituto de Biologia y Medicina Experimental, Costa Rica 4185, Buenos Aires.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 160—168 (1953).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Basel.

Die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin auf die Funktion der Thyreoidea*.

Von

E. Flückiger und F. Verzár.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Februar 1953.)

Die Wirkung von Adrenalin auf die Funktion der Thyreoidea ist wiederholt untersucht worden. Williams, Jaffe u. Kemp (1949)[10] fanden nach Adrenalin eine deutliche Hemmung der ^{131}J-Aufnahme in die Thyreoidea, sowie eine Abnahme des Jodgehaltes des Blutplasmas. Botkin u. Jensen (1952)[1] fanden dasselbe, haben aber ihre Befunde als beschleunigte Abgabe von Jod bzw. Thyroxin aus der Thyreoidea gedeutet. Auch Soffer, Gabrilove u. Jailer (1949)[7] fanden beim normalen Tier nach Adrenalin eine verminderte ^{131}J-Aufnahme. Bei adrenalektomierten Tieren haben sie umgekehrt nach Adrenalin eine vermehrte ^{131}J-Aufnahme in die Thyreoida beschrieben. In ihren oben erwähnten Versuchen haben dagegen Williams u. Mitarb. nach Adrenalektomie eine besonders starke Hemmung der ^{131}J-Aufnahme erhalten.

Bekanntlich verursacht Adrenalin eine Ausschüttung von Corticosteroid-Hormonen [siehe z. B. Pickford u. Vogt (1951)[5]]. Das legt den Gedanken nahe, daß Adrenalin seine Wirkung auf die Thyreoidea möglicherweise durch Vermittlung von Corticosteroiden ausübt, denn Verzár u. Vidovic (1951)[8] hatten gezeigt, daß Corticosteroide die ^{131}J-Aufnahme in die Thyreoidea hemmen. Diese Wirkung geht nicht über den HVL, bzw. über die Ausscheidung von thyreotropem Hormon, sondern greift direkt an der Thyreoidea an[9].

Die folgenden Versuche sollen die Wirkung von Adrenalin sowie Noradrenalin und deren Angriffspunkte auf die Thyreoidea aufklären.

Methodik.

Wir untersuchten die Funktion der Thyreoidea mit ^{131}Jod nach der von uns beschriebenen Methode am lebenden Tier[8,9]. Weißen ♂ Ratten von rund 200 g Körpergewicht wurde ^{131}J in Mengen von 25 Mikrocurie (μc) in 0,9% NaCl gelöst i. p. injiziert. Die Tiere kommen im Ätherrausch unter ein Geiger-Zählrohr TGC-2

* Herrn Prof. Dr. O. Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

(Tracerlab). Gezählt wird die Stoßzahl über der Thyreoidea am Ort der maximalen Strahlung zu den in den Versuchsprotokollen angegebenen Stunden. Die Zählungen werden während 2 Tagen fortgesetzt.

Die Adrenalinektomie geschah vom Rücken doppelseitig. 5—6 Tage später wurden die Tiere geprüft. Unbehandelte Tiere sind dann meist adynam; solche, die 1% NaCl im Trinkwasser erhielten oder 1—2 mg DCA (Desoxycorticosteronacetat) bekamen, sind in gutem Zustand.

Adrenalin oder Noradrenalin wurde in einer Verdünnung von 1:10000 injiziert.

Versuche.

1. Wirkung von Adrenalin auf die Jodaufnahme der Thyreoidea von normalen Ratten.

Normale Ratten wurden in Serien in der folgenden Weise untersucht. In jeder Serie befanden sich 3—4 Tiere, die mit Adrenalin injiziert wurden, und mindestens 2—3 ebensolche Kontrolltiere, die kein Adrenalin erhielten. Allen Tieren wurde zur selben Zeit ^{131}Jod injiziert. Auf diese Weise werden jeweils gleiche Tiere mit ^{131}J derselben Sendung kontrolliert, so daß auch kleine Unterschiede in der Aktivität ausgeglichen werden. Die Stoßzahl wurde nach 4, 16, 24 und 48 Std bestimmt.

Der Wert nach 16 Std ist bei den Kontrolltieren gewöhnlich der Maximalwert der Jodspeicherung in der Thyreoidea und wird zu 100% genommen. Mit diesen werden nun alle anderen Werte verglichen. Alle Kurven bedeuten demnach Prozente der normalen maximalen Speicherung. Der mittlere Fehler des Mittelwertes ist in den Kurven als Streuung: $\varepsilon = \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{n(n-1)}}$ angegeben.

Die Versuche sind in Abb. 1 dargestellt.

Die Kurve A der Jodaufnahme bei normalen unbehandelten Tieren beruht auf Mittelwerten von 25 Einzelversuchen. Diese zeigen sehr geringe Streuung, was die Verwertbarkeit unserer Methodik beweist. Die Kurve erreicht ihr Maximum nach 16 Std. Der Wert nach 48 Std ist 85%.

Die Versuche mit den Tieren, welche mit Adrenalin behandelt wurden, sind in der daneben stehenden Kurve B wiedergegeben. Es wurden 3 verschiedene Gruppen gebildet. 14 Tiere erhielten 25 γ Adrenalin, 7 Tiere 50 γ und 4 Tiere 100 γ pro 100 g Körpergewicht und pro Injektion. Die Zeiten der Injektionen sind in Abb. 1 unten angegeben. In den meisten Fällen wurde 2 Std und 1 Std vor der Injektion von ^{131}J und nach der Injektion sogleich, ferner nach 1, 3, 4, 5 und 6 Std Adrenalin gegeben. In einzelnen Versuchen wurden auch 24, 10 und 3 Std vor der ^{131}J-Injektion Adrenalin injiziert. Diese gaben aber kein anderes Resultat und sind mit den anderen zusammen behandelt.

In allen Versuchen war die ^{131}J-Aufnahme in die Thyreoidea nach Adrenalin gegenüber den normalen Kontrolltieren deutlich vermindert.

Dabei war zwischen Versuchen mit 25, 50 und 100 γ Adrenalin kein deutlicher Unterschied. Die Kurve ist mit den Werten jener Serie gezeichnet, in welcher 14 Tiere 25 γ Adrenalin erhielten. Auffallend ist, daß die Versuche nach Adrenalininjektion viel größere Streuung zeigen als die Kontrollversuche. Bezüglich der Dosierung sei bemerkt, daß die Dosis von 50 γ und 100 γ pro 100 g bereits ausgesprochene Allgemeinwirkungen hat.

Die Verlangsamung der ^{131}J-Aufnahme nach Adrenalinbehandlung ist besonders nach 4 Std deutlich. Die Werte sind 39—46%, während

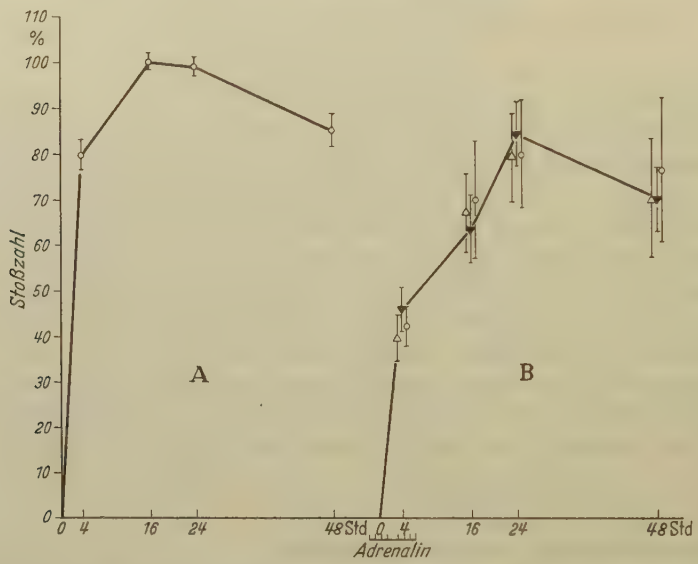


Abb. 1. A ^{131}J-Aufnahme bei normalen unbehandelten Ratten (Kontrollen). Mittelwerte von 25 Tieren. Ordinate: Stoßzahl in Prozenten des 16 Std-(Maximal)-Wertes. Abszisse Zeit; B ^{131}J-Aufnahme bei mit Adrenalin behandelten Tieren. Unten Zeitangabe der Adrenalin-Injektionen. Sonst wie bei *A*. ▼ 100 γ Adrenalin pro 100 g (Mittelwerte von 4 Tieren); △ 50 γ Adrenalin pro 100 g (Mittelwerte von 7 Tieren); ○ 25 γ Adrenalin pro 100 g (Mittelwerte von 14 Tieren).

die unbehandelten Tiere zur selben Zeit 80% Jodaufnahme in die Thyreoidea zeigen. Nach 16 Std ist die Jodaufnahme nach Adrenalin 62—69% gegenüber 100% bei den unbehandelten. Nach Adrenalinbehandlung wurde der Maximalwert erst nach 24 Std erreicht und war nicht höher als 83% des normalen Maximalwertes.

2. Wirkung von Adrenalin auf die Abgabe von ^{131}Jod aus der Thyreoidea.

Nachdem die hemmende Wirkung des Adrenalins auf die Jodaufnahme in den vorangehenden Versuchen festgestellt war, sollte untersucht werden, ob auch die Abgabe von Jod aus der Thyreoidea durch

Adrenalin beeinflußt wird. Hierzu wurden die in Abb. 2 wiedergegebenen Versuche gemacht.

6 Tiere wurden mit je 25 μc ^{131}J i.p. injiziert. Bei 4 von diesen Tieren wurde 16 Std später, als das ^{131}J bereits in der Thyroidea angehäuft war, Adrenalin (25 γ pro 100 g) s. c. gegeben und das stündlich von der 16.—30., 40.—54., von der 64. bis zur 71. Std wiederholt. Die nicht mit Adrenalin behandelten 2 Tiere dienten als Kontrollen. Der ermittelte

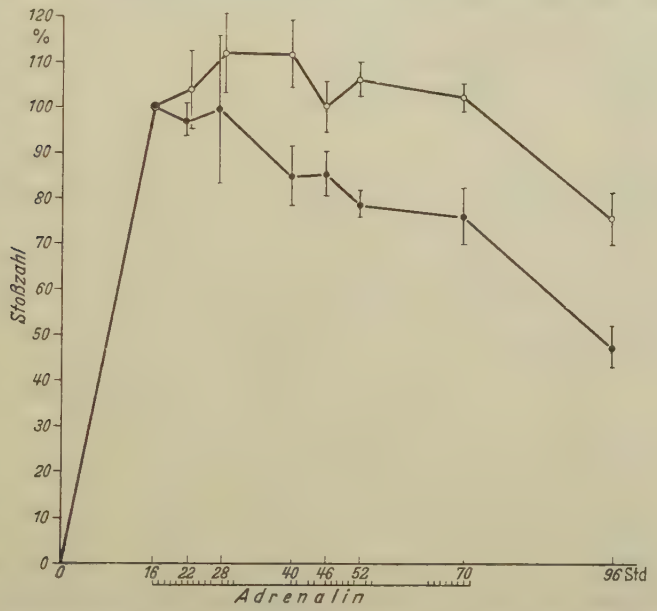


Abb. 2. ^{131}J-Aufnahme und Abgabe aus der Thyreoidea. • unbehandelte Tiere (Kontrollen) (Mittel von 2 Tieren); o mit Adrenalin behandelte Tiere (Mittel von 4 Tieren). Die Adrenalin-Injektionen beginnen erst in der 16. Std nach der ^{131}J-Injektion.

16 Std-Wert der 6 Tiere wird als 100% benützt, und alle Werte auf diesen bezogen.

In den ersten 16 Std ist die ^{131}J-Aufnahme in beiden Gruppen gleich. Als nun der einen Gruppe Adrenalininjektionen gegeben wurden, wurde das Jod langsamer abgegeben als bei den normalen Tieren. Während bei den unbehandelten zwischen der 16. und der 71. Std der Jodgehalt von 100 auf 76% abnimmt, ist er bei den mit Adrenalin behandelten Tieren noch immer um 100%. Die Adrenalinbehandlung hat also die ^{131}J-Abgabe vollkommen gehemmt. Diese beginnt erst, nachdem mit den Adrenalininjektionen aufgehört wurde. Nach 96 Std war bei den nicht behandelten normalen Tieren noch 47%, bei den mit Adrenalin behandelten Tieren noch 75% Jod in der Thyreoidea vorhanden. Es ist demnach

bewiesen, daß Adrenalin nicht nur die Jodaufnahme sondern auch die Jodabgabe aus der Thyreoidea hemmt, d. h. auch die Abgabe von Thyroxin.

3. Die Wirkung von Adrenalin auf die ^{131}J-Aufnahme in die Thyreoidea bei adrenalektomierten Tieren.

Bekanntlich fördert Adrenalin die Ausscheidung von Corticosteroiden. Andererseits war festgestellt[8], daß Corticosteroid-Hormone die Thyreoidea hemmen. Es war deshalb zu untersuchen, ob die durch Adrenalin beobachtete Hemmung der Thyreoidea möglicherweise die Folge der Ausscheidung von Nebennierenrindenhormonen ist.

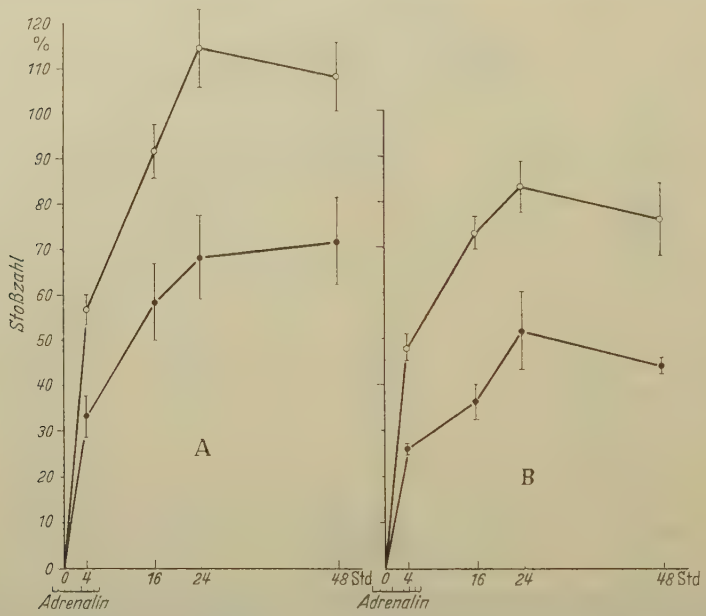


Abb. 3. A ^{131}J-Aufnahme bei adrenalektomierten Tieren, welche 1% NaCl Trinkwasser erhielten. • mit Adrenalin behandelte Tiere (Mittelwerte von 9 Tieren); ○ ohne Adrenalin-Injektion (Mittelwerte von 11 Tieren). B ^{131}J-Aufnahme bei adrenalektomierten Tieren, welche 2 mg DCA pro Tag i. m. injiziert erhielten. • mit Adrenalin behandelte Tiere (Mittelwerte von 6 Tieren); ○ ohne Adrenalin-Injektion (Mittelwerte von 16 Tieren).

Für diese Versuche haben wir 2 Gruppen von Tieren benützt. Alle Tiere wurden adrenalektomiert. Die eine Gruppe A, bestehend aus 20 Tieren, erhielt 1% NaCl im Trinkwasser und wurde in entsprechend gutem Zustand am 6. Tag nach der Adrenalektomie untersucht. Alle 20 Tiere erhielten ^{131}J (25 γ pro 100 g). Von diesen Tieren haben 9 Tiere in den in der Abb. 3 A angegebenen Zeiten Adrenalin erhalten. Wie die

untere Kurve zeigt, ist die ^{131}J-Aufnahme in die Thyreoidea auch bei diesen adrenalektomierten Tieren stark gehemmt worden.

Die unbehandelten adrenalektomierten Tiere zeigen etwas andere Jodaufnahme als die normalen Kontrollen der Abb. 1, auf welche alle Werte bezogen sind. Die Unterschiede sind aber nicht wesentlich.

In der anderen Gruppe B haben wir 22 adrenalektomierte Tiere benützt, welche vom Tag der Adrenalektomie an 2 mg Desoxycorticosteronacetat (Percorten Ciba) intramuskulär injiziert erhielten. Die Tiere waren in gutem Zustand. Von diesen Tieren erhielten 6 Adrenalininjektionen und 16 blieben unbehandelt. In Abb. 3 B sind diese Versuche wiedergegeben. Alle Werte sind auf den Maximalwert der Normalkurve der Abb. 1 als 100% bezogen.

Die mit Adrenalin behandelten Tiere haben eine ausgesprochen geringere Jodaufnahme in die Thyreoidea. Es fällt auf, daß auch die nicht mit Adrenalin behandelten, adrenalektomierten Tiere eine etwas geringere Jodaufnahme als normale Tiere haben.

Beide Versuchsreihen an adrenalektomierten Tieren, die entweder mit NaCl oder mit DCA am Leben erhalten waren, zeigen also, daß die durch Adrenalin bedingte Hemmung der Thyreoidea nicht über die Nebennierenrinde geht.

4. Die Wirkung von Noradrenalin auf die ^{131}J-Aufnahme in die Thyreoidea bei normalen Tieren.

Noradrenalin wirkt auf verschiedene Organe anders als Adrenalin (Euler 1950[2, 3]; Gaddum 1950[4]). Es schien deshalb wichtig, zu vergleichen, wie sich Noradrenalin im Verhältnis zu Adrenalin bezüglich der Thyreoidea-Funktion verhält.

In den in Abb. 4 dargestellten Versuchen wurden 10 normale unbehandelte Tiere als Kontrollen benützt. 10 weitere Tiere erhielten 25 γ Adrenalin pro 100 g und 11 Tiere erhielten Noradrenalin, und zwar bekamen vier 25 γ, vier 50 γ und drei 100 γ pro 100 g Körpergewicht zu den in der Abbildung angegebenen Zeiten.

Wie die Abb. 4 A zeigt, hemmt Adrenalin ähnlich wie in den früheren Versuchen die Jodaufnahme und -Abgabe aus der Thyreoidea. Abb. 4 B zeigt, daß Noradrenalin nach 4 Std ebenfalls eine hemmende Wirkung hat, die nicht sehr verschieden von der von Adrenalin ist. Anders aber nach 16 Std, d. h. 10 Std nach der letzten Injektion. Eine Hemmungswirkung von Noradrenalin ist mit 25 γ und 50 γ nicht zu sehen; nur mit 100 γ-Dosen ist sie bemerkbar, und nach 24 Std ist auch diese verschwunden. Jetzt liegen die Werte der mit Noradrenalin behandelten Tiere ebenso hoch wie die der Normaltiere. Allerdings zeigen sich auch

hier große Streuungen, im Gegensatz zu den Versuchen an unbehandelten Tieren. Die Hemmungswirkung von 25 γ-Dosen Adrenalin besteht aber immer noch.

Versucht man die Wirkung von Noradrenalin mit Adrenalin zu vergleichen, so muß man sagen, daß während den Injektionen, 4 Std nach der ^{131}J-Gabe, Noradrenalin kaum schwächer wirkt als Adrenalin. Dagegen ist bezüglich des Überdauerns der Wirkung selbst 100 γ Noradrenalin viel schwächer als 25 γ Adrenalin.

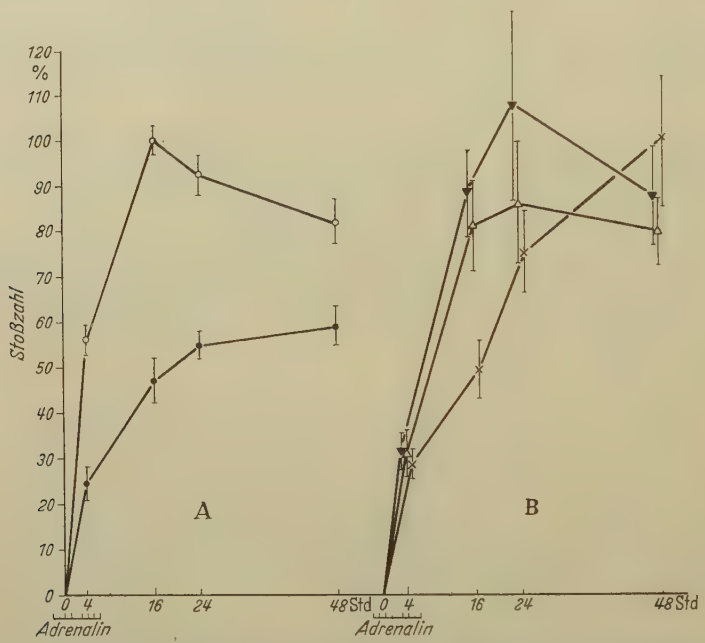


Abb. 4. A ^{131}J-Aufnahme nach Adrenalin und bei unbehandelten Tieren. ○ Normale unbehandelte Tiere (Mittelwerte von 10 Tieren; 16 Std-Wert = 100%); • mit 25 γ/100 g Adrenalin behandelte Tiere. Unten Zeitangabe der einzelnen Injektionen (Mittelwerte von 10 Tieren). B ^{131}J-Aufnahme nach Noradrenalin-Injektion; △ 25 γ/100 g Noradrenalin (Mittelwert von 4 Tieren); ▼ 50 γ/100 g Noradrenalin (Mittelwert von 4 Tieren); × 100 γ/100 g Noradrenalin (Mittelwert von 3 Tieren).

Diskussion.

Diese an Ratten durchgeführten Messungen der ^{131}J-Aufnahme in die Thyreoidea zeigen, daß sowohl die Aufnahme von Jod wie auch die Abgabe des Hormons aus der Thyreoidea durch Adrenalin gehemmt wird. Zum Unterschied von Versuchen von anderen sei erwähnt, daß Adrenalin nicht nur einmal, sondern in stündlichen oder 2stündigen Perioden bis zu 8mal innerhalb eines Tages gegeben wurde. Die Thyreoidea

stand während der Zeit unter einer dauernden Wirkung des Adrenalins. Unterschiede gegenüber anderen Befunden könnten sich daraus erklären.

Auch adrenalektomierte Tiere zeigen dieselbe Hemmung durch Adrenalin. Diese kann also nicht so erklärt werden, daß durch den Reiz des Adrenalins auf den Hypophysenvorderlappen ACTH abgegeben und dadurch Nebennierenrindenhormon secerniert wird.

Dagegen können unsere Versuche nichts darüber aussagen, ob Adrenalin nicht eventuell eine Hemmung der Abgabe von thyreotropem Hormon aus dem Hypophysenvorderlappen verursacht. Bezüglich der Corticoide haben entsprechende Versuche[9] gezeigt, daß deren hemmende Wirkung auch bei hypophysektomierten, mit thyreotropem Hormon behandelten Tieren vorhanden ist.

Bei unseren Versuchen kann es sich schwerlich um eine vasokonstriktorische Wirkung des Adrenalins auf die Thyreoidea handeln (Reiss und Mitarb. 1949[6]), weil, wie aus allen Versuchsserien hervorgeht, die Adrenalinhemmung die Injektionen sehr lange überdauert, was keinesfalls der rasch ablaufenden Vasokonstriktion durch Adrenalin entspricht.

Von besonderem Interesse scheint zu sein, daß Noradrenalin akut, direkt nach der Injektion, ähnlich stark hemmt wie Adrenalin, daß aber die Wirkung von Noradrenalin nicht überdauert wie die von Adrenalin, und daß bei längeren Versuchsperioden selbst 100 γ Noradrenalin nicht so stark wirken wie 25 γ Adrenalin.

Zusammenfassung.

1. Die ^{131}J-Aufnahme in die Thyreoidea der Ratte wird durch Adrenalin in Dosen von 25 γ pro 100 g, mehrfach wiederholt, stark gehemmt.

2. Versuche, bei welchen zuerst die Aufnahme von ^{131}J in die Thyreoidea abgewartet, und erst dann dieselben Adrenalin-Mengen injiziert wurden, zeigten, daß auch die Jodabgabe stark gehemmt wird.

3. Die Hemmungswirkung ist auch an adrenalektomierten Tieren zu sehen, welche entweder mit 1% NaCl im Trinkwasser oder mit DCA behandelt waren. Sie beruht also nicht auf einer Ausschüttung von Nebennierenrindenhormon.

4. Noradrenalin wirkt im akuten Versuch ähnlich hemmend wie Adrenalin. Seine Wirkung überdauert aber nicht wie jene des Adrenalins, und nach 16—24 Std ist sie vielfach schwächer als die des Adrenalins.

Wir verdanken der Ciba A.G. in Basel die Überlassung von reinem l-Adrenalintartrat und l-Noradrenalin-Hydrochlorid und ebenso von „Percorten Ciba“ für diese Versuche.

Literatur.

[1] Botkin, A. L., and H. Jensen: Endocrinology **50**, 68 (1952). — [2] Euler, U.: Erg. Physiol. **46**, 261 (1950). — [3] Euler, U.: Meth. Med. Res., Chicago **3**, 131 (1950). — [4] Gaddum, J. H.: Meth. Med. Res., Chicago **3**, 116 (1950). — [5] Pickford, M., and M. Vogt: J. of Physiol. **112**, 133 (1951). — [6] Reiss, R. S., P. H. Forsham and G. W. Thorn: J. Clin. Endocr., Springfield **9**, 659 (1949). — [7] Soffer, L. J., and J. L. Gabrilove and J. W. Jailer: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **71**, 117 (1949). — [8] Verzár, F., u. V. Vidovic: Helvet. physiol. acta **9**, 214 (1951). — [9] Verzár, F., u. V. Vidovic: J. Endocr. (Oxford) **8**, 321 (1952). — [10] Williams, R. H., H. Jaffe and C. Kemp: Amer. J. Physiol. **159**, 291 (1949).

Dr. E. Flückiger und Dr. F. Verzár, Physiol. Institut d. Univ. Basel/Schweiz.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 169—184 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke).

Über den Vergleich einer chemischen und biologischen Bestimmungsmethode von Adrenalin und Noradrenalin im Nebennierenvenenblut nach Hypothalamusreizung*.

Von

F. Brücke, F. Kaindl, W. Kobinger, O. Kraupp und H. Mayer.

(Eingegangen am 2. März 1953.)

In einer schon 1944 fertiggestellten, aber aus äußeren Gründen erst 1947 veröffentlichten Arbeit haben P. Holtz, K. Credner u. G. Kroneberg[10] zum ersten Male die Ansicht ausgesprochen, daß sich im Nebennierenmark neben Adrenalin auch Noradrenalin (Arterenol) findet. Diese Meinung wurde von P. Holtz u. H. J. Schümann[11] in einer zweiten Arbeit (Juli 1948) dadurch näher erhärtet, daß Kristallisate aus Rindernebennierenmark biologisch sich nicht so verhielten wie reines l-Adrenalin, sondern in ihrer Wirkung einem Gemisch von 25 bis 35% Noradrenalin mit 65 bis 75% Adrenalin entsprachen. Seither sind diese Arbeiten wiederholt bestätigt worden und es wurde auch im Nebennierenvenenblut ein Gemisch der beiden Hormone angenommen. Die Bestimmungen erfolgten jedoch immer auf biologischem Wege, indem 2 Objekte verwendet wurden, von denen eines erheblich empfindlicher gegen Adrenalin (z. B. Hühnerblinddarm) und das andere etwas empfindlicher gegen Noradrenalin reagierte (z. B. der Katzenblutdruck). Aus dem Wirkungsverhältnis an beiden Organen wurden die relativen Anteile beider Hormone rechnerisch ermittelt (E. Bülbring, H. Burn[4], U. S. v. Euler[6]). Gegen alle derartigen Methoden wurden vor allem von Gaddum u. Lembeck[8] Bedenken erhoben.

Einen großen Fortschritt brachte die Anwendung der Papierchromatographie zur Auftrennung der beiden Katechole (James[13], Goldenberg et al.[9] und Euler[7]). Es ist das Verdienst von Crawford[5] u. Outschoorn, diese Methode zur Trennung mit nachfolgender biologischer Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin bis zu Mengen unter 1 μg je Kubikzentimeter im Blutplasma ausgearbeitet zu haben. Gleichzeitig wurde auch die Empfindlichkeit der chemischen Nachweismethoden, insbesondere die der fluorometrischen Bestimmung der beiden Katechole, weiter erhöht (Lund[16]).

* Herrn Hofrat Prof. Dr. Otto Loewi in Dankbarkeit zum 80. Geburtstag gewidmet.

In der vorliegenden Arbeit wollten wir durch Kombination der papierchromatographischen Trennung und der fluorometrischen Bestimmung eine Methode ausarbeiten, die es gestattete, unabhängig vom biologischen Testobjekt die Mengenverhältnisse des im Nebennierenvenenblut enthaltenen Adrenalins und Noradrenalins zu bestimmen. Mit dieser Methode waren wir dann in der Lage, die bei unseren früheren Versuchen[1, 2, 3] über den Adrenalin- und Noradrenalingehalt im Nebennierenvenenblut unter verschiedenen Reizbedingungen verwendete biologische indirekte Methode zu überprüfen bzw. einen Vergleich der mit beiden Methoden erhaltenen Ergebnisse durchzuführen. Zu diesem Zwecke wiederholten wir unsere früheren Versuche[3] über den Einfluß der elektrischen Reizung des Hypothalamus auf die Adrenalin-Noradrenalinsekretion des Nebennierenmarkes.

Methodik.

Die Versuche wurden an Katzen in Chloralosenarkose durchgeführt. Beide Halsvagi wurden durchschnitten und der Blutdruck in der Arteria femoralis manometrisch registriert. Die li. Nebenniere wurde wie in unseren früheren Versuchen[1] kanüliert und die Kanüle durch eine Öffnung der Bauchhaut nach außen geführt. Um während der Probeentnahmen das Blut in die Kanüle rückstauen zu können, wurde ein Faden um die Einmündungsstelle der li. Nebennierenvene in die V. cava geschlungen, dessen Anspannung einen Verschluß der Nebennierenvene bewirkte. Die Reizelektroden bestanden aus bis an die Spitze isolierten, 2 mm voneinander entfernten Drähten aus V_2A-Stahl und wurden durch eine Trepanöffnung über dem re. Tuber parietale durch die intakte Dura 2,4 cm tief in Richtung auf die Medianlinie eingestochen. Die Reizung erfolgte durch Rechteckstromstöße mit dem Impulschronaxiemeter der Fa. Schuhfried. Die Reizfrequenz betrug je nach den einzelnen Versuchen 10—100 Hertz bei einer Reizdauer von 0,5 msec. Die Intensität wurde innerhalb der einzelnen Versuche variiert und betrug 2—10 mA. Die entnommenen Blutproben wurden in eisgekühlten Eprouvetten aufgefangen, wobei zu jeder Probe 2 Tropfen Heparin und 1 mg Ascorbinsäure zugesetzt wurden. Die Austestung der einzelnen Blutproben auf ihren Gehalt an Adrenalin und Noradrenalin erfolgte nach 3 Methoden:

1. Fluorometrische Bestimmung nach vorheriger chromatographischer Trennung.

a) Papierchromatographische Trennung.

Diese wurde nach der Methode von Outschoorn u. Crawford[5] unter Berücksichtigung der von M. Vogt[20] vorgeschlagenen Verbesserungen durchgeführt. Im einzelnen wurde wie folgt verfahren: Die Blutproben wurden innerhalb ½ Std nach der Abnahme zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und eine genau abgemessene Menge (0,2—1,9 cm^3) tropfenweise in das 10fache Volumen einer Mischung von 0,05 cm^3 konzentrierter Salzsäure und 100 cm^3 95% Äthylalkohol eingebracht. Gleichzeitig wurde der Hämatokritwert der Blutproben für die spätere Umrechnung der Adrenalinplasmawerte auf die Adrenalinkonzentrationen im Vollblut bestimmt. Nach kräftigem Umschütteln wurden die Proben 1 Std lang auf Eis aufbewahrt. Hierauf wurde scharf abzentrifugiert (3000 U./min). Die überstehende alkoholische Lösung wurde in 50 cm^3 Langhalsrundkölbchen übergeführt, wobei der Rückstand 2mal mit je 2 cm^3 der Salzsäure-Alkohollösung unter Aufschütteln und Zentrifugieren nachgewaschen wurde. Die alkoholische Lösung

wurde sodann im Vakuum bei einer Temperatur von 55—60° auf dem Wasserbade zur Trockene gebracht. Das Vakuum wurde erst nach Abkühlen der Kölbchen auf Zimmertemperatur entfernt. Der Rückstand wurde in 0,75 cm³ Salzsäure-Alkohol (0,1 cm³ konzentriertem HCl in 100 cm³ 96%igem Alkohol) unter sorgfältigem Abspülen der Wände des Rundkölbchens aufgelöst. Die Auftragung der Lösung auf das Chromatographiepapier (Whatman Nr. 1) erfolgte genau nach der von Crawford u. Outschoorn[5] beschriebenen Weise innerhalb eines 10 cm langen und 0,5 cm breiten, waagerechten Streifens 5 cm über der unteren Kante der insgesamt 43 cm breiten und 40 cm hohen Papierbögen. Auf jeden dieser Bögen wurden 2 Proben aufgetragen, die durch einen etwa 5 cm breiten Leerstreifen getrennt waren. Am Rande des Bogens wurde ein Tropfen einer 1%igen Lösung der beiden Katechole in 0,01 n HCl innerhalb eines Teststreifesns von 6 cm Breite aufgetragen. Die Filterbögen wurden 6 Std vor der Verwendung in großen Glasschalen mit 0,01 n HCl gewaschen, an der Luft getrocknet und 1 Std vor dem Auftragen der Proben mit einer 0,5%igen Ascorbinsäurelösung besprüht. Die chromatographische Trennung erfolgte in 45 cm hohen Glaszylindern mit 20 cm Durchmesser, deren Schliffdeckel einen Schliffansatz mit einer Gaseinleitungsvorrichtung aufwiesen. Als Entwicklungsflüssigkeit diente eine 15%ige Lösung von 0,1 n Salzsäure in wasserfreiem Phenol, das vorher einmal über Zinkstaub abdestilliert worden war. Für die Duchführung der chromatographischen Trennung wurden die Glaszylinder 1,5 cm hoch mit der salzsauren Phenollösung beschickt und das Chromatographiepapier durch Nähte zu einer Rolle zusammengehalten, senkrecht in das Glasgefäß hineingestellt. Nun wurde verschlossen und ein kräftiger Strom Kohlendioxyd durch die Gaseinleitungsvorrichtung, deren Einleitungsrohr bis knapp über die Oberfläche der Phenollösung reichte, 15 min lang durch den Glaszylinder hindurchgeschickt. Die Temperatur während der Wanderung betrug 15 20° und die Dauer der Wanderung 36—48 Std. Nach Beendigung der Trennung wurden die Papierbögen 2mal hintereinander in reinstem Benzol gewaschen und an der Luft getrocknet. Der Teststreifen wurde abgetrennt und mit einer Kaliumferricyanidlösung (0,44% in 0,2 m Phosphatpuffer p_H 7,8) besprüht. Entsprechend dem Wanderungsort des Adrenalins und Noradrenalins im Teststreifen (der höher gewanderte rote Fleck entspricht dem Adrenalin) wurden die Streifen mit den Versuchsansätzen in etwa 6 cm breite, waagerechte Streifen geschnitten und nach sorgfältiger Kennzeichnung die Elution mit einer 0,4%igen $NaH_2PO_4 \cdot 2\,H_2O$-Lösung durchgeführt, der 1 mg/100 cm³ Ascorbinsäure zugesetzt wurde. Die Elution erfolgte über Nacht in kleinen, 8 cm langen und 1 cm breiten Glaströgen, in die die einzelnen Papierstreifen eingeklemmt zwischen 2 Objektträger in etwa 8—10 cm³ der Elutionsflüssigkeit eintauchten. Die Papierstreifen wurden über den oberen Rand der Objektträger senkrecht nach unten gebogen, wobei die aus dem Trog aufgesaugte Elutionslösung vom unteren, zungenförmig zugespitzten Ende in kleine Bechergläser abtropfte. Die gesamte Elutionsvorrichtung war in einer feuchtigkeitsdicht verschlossenen Glaswanne untergebracht. Nach 15 Std wurde die Elution abgebrochen und die einzelnen Proben der fluorometrischen Messung zugeführt.

b) Fluorometrische Bestimmung.

Die fluorometrische Bestimmung erfolgte in Anlehnung an die von Lund[15] entwickelte quantitative Nachweismethode von Adrenalin in Blut. Hiernach wird Adrenalin in schwach saurer Lösung in heterogener Reaktion mittels Mangandioxyd zu Adrenochrom aufoxydiert und durch Zentrifugieren und Filtrieren nach vollzogener Oxydation von dem Oxydationsmittel abgetrennt. Die Überführung von Adrenochrom in das stark fluorescierende Adrenolution erfolgte durch Zusatz starken Alkalis, wobei die entstehende Fluorescenz durch gleichzeitige Zugabe von

Ascorbinsäure gegen eine Zerstörung durch weiterschreitende Oxydation stabilisiert wird. In einer weiteren Arbeit von Lund (Acta. Pharm. Scand. **6**, 139) wird dieselbe Methode auch zur fluorometrischen Bestimmung von Noradrenalin angewandt. Zum Unterschied von Adrenalin erwies sich jedoch die Aufoxydation des Noradrenalins als stark vom p_H abhängig, wobei die optimalen Bedingungen zur Erzeugung einer Fluorescenz im p_H-Bereich zwischen 6,5—7,5 liegen. Bei der Ausführung der von Lund der beschriebenen Methoden bei dem p_H unserer Elutionsflüssigkeit (p_H 5,3—5,4) erhielten wir bei der Oxydation von Adrenalin mittels Mangandioxyd sehr gute Werte. Bei der analogen Bestimmung des Noradrenalins war die Fluorescenz in dem für unsere Zwecke erwünschten Konzentrationsbereich sehr schwach und überdies innerhalb der einzelnen Konzentrationen sehr inkonstant. Wir führten diesen Mißerfolg auf eine ungenügende Aufoxydation in diesem p_H-Bereich zurück und versuchten es mit einem stärkeren Oxydationsmittel. Als solches verwendeten wir Bleidioxyd, mit dem wir schließlich in vereinfachter Arbeitsweise sowohl bei Adrenalin wie auch bei Noradrenalin gute Resultate erhielten. Die nach unserer Arbeitsweise mit Noradrenalin in Konzentrationen von 0,2 μg bis 2,0 μg entwickelte Fluorescenzintensität betrug 37—38% der Fluorescenzintensität äquivalenter Adrenalinkonzentrationen. Die unterste Grenze der Nachweisempfindlichkeit lag bei 0,08 μg/10 cm³ Adrenalin und 0,16 μg/10 cm³ Noradrenalin.

Bei der praktischen Durchführung der fluorometrischen Messung erwiesen sich die nach der Elution der Papierstreifen anfallenden Lösungen infolge Auftretens einer starken blauen Eigenfluorescenz für die direkte Messung ungeeignet. Es gelang jedoch durch wiederholtes Ausschütteln mit Benzol, die diese Störfluorescenzen verursachenden Substanzen zu entfernen. Zu diesem Zwecke führten wir die einzelnen Elutionslösungen unter gutem Nachwaschen in 25 cm³ Zentrifugengläser mit Schliffverschluß über und schüttelten die Proben 4mal hintereinander mit je 8—10 cm³ analysenreinem Benzol 3 min lang kräftig durch. Die benzolische Schichte wurde dabei jedesmal durch Absaugen entfernt. Zuletzt wurde die wäßrige Phase in 50 cm³ Rundkölbchen übergespült, nachgewaschen und im Vakuum bei 55—60° auf zwei Drittel des ursprünglichen Volumens eingeengt. Die Proben wurden nun in ein 10 cm³ Meßkölbchen übergespült und unter Nachwaschen mit doppelt destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wurde schließlich in 25 cm³ Schliffstopfengläser übergeführt, mir 0,5 cm³ Elutionslösung nachgewaschen und mit 0,15 g feinst pulverisiertem Bleidioxyd 1 min lang geschüttelt. (Das zu diesem Zwecke verwendete Bleidioxyd muß äußerst rein und nicht durch Beimengung fluorescierender Substanzen verunreinigt sein. Da bei jeder heterogenen Reaktion der Verteilungsgrad der festen Phase von großem Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit ist, wurde außerdem großer Wert auf möglichst feine Zerkleinerung gelegt. Das Bleidioxyd wurde für jede Versuchsreihe und dazugehörige Eichreihe stets frisch im Porzellanmörser zerrieben und so im gleichen Zustand für alle Meßwerte angewandt. Wir verwendeten das für die chemische Elementaranalyse bestimmte granulierte Bleidioxyd der Firma Merck-Darmstadt.) Nach der Oxydation wurde vom Bleidioxyd abfiltriert. Um ein klares Filtrat zu erzielen, genügte 2maliges Filtrieren durch ein und dasselbe Filter (Schleicher und Schüll, Nr. 595).

Für jede Versuchsreihe wurden 4 Adrenalin- bzw. Noradrenalinlösungen (gelöst in Elutionsflüssigkeit) in Konzentrationen, die für die betreffende Versuchsreihe zu erwarten waren, in gleicher Weise der Oxydation unterworfen und nachher fluorometrisch mitbestimmt. Die fluorometrische Bestimmung wurde mit dem Pulfrich-Photometer durchgeführt. Als U. V.-Quelle diente eine Analysenlampe der Firma Phillips, Typ 75202 E/70. Der primäre Strahlengang wurde außerdem

noch durch ein U. G. 1-Filter der Firma Schott von den letzten Resten sichtbaren Lichts befreit. Als Vergleichsstandard diente ein Uranglaskeil, dessen Grünfluorescenz durch Graufilter auf die erwünschte Intensität abgeschwächt wurde. Der sekundäre Strahlengang wurde durch Euphosfilter der Firma Zeiss von mitgestreutem U. V.-Licht befreit. Die Flourescenzintensität der Versuchslösungen wurde in Prozent der konstanten Vergleichsfluorescenz gemessen und mit den entsprechenden Werten der Eichlösungen verglichen. Hierzu wurden die nach der Bleidioxydoxydation anfallenden Filtrate in Küvetten von 3 cm Schichtdicke eingefüllt und die Flourescenzintensität der schwach sauren Lösungen gemessen. Diese betrug im Durchschnitt höchstens um 5% mehr als die Fluorescenz der als Elutionsflüssigkeit verwendeten Phosphatpufferlösung. Nun wurde 1 cm³ einer frisch bereiteten Mischung von 5 cm³ 20%iger Natronlauge und 1 cm³ einer frisch bereiteten 1%igen Ascorbinsäurelösung zugesetzt, mit einem Glasstab gut durchgerührt und die Fluorescenz neuerlich bestimmt. Während die Adrenalinlösungen innerhalb 1 min ein konstantes Fluorescenz-Maximum erreichten, dauerte es beim Noradrenalin einige Minuten bis zum Erreichen konstanter Fluorescenzwerte. Sowohl bei den Eichlösungen wie bei den Meßwerten wurden von diesen konstanten Endwerten die vorher gemessenen Leerfluorescenzwerte zur Aufstellung der Eichkurven und Berechnung der unbekannten Katecholwerte abgezogen. Die Eichkurven waren Gerade, die durch den Koordinatenursprung gingen. Zur Prüfung der Verläßlichkeit der nach chromatographischer Trennung fluorometrisch bestimmten Katecholwerte setzten wir in einer Reihe von Versuchsansätzen Adrenalin und Noradrenalin in verschiedenen Mengen- und Mischungsverhältnissen zu Blutplasma zu und bestimmten beide Katechole mittels der oben beschriebenen Methode. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 wiedergegeben.

Tabelle 1.

Nr.	Adrenalin			Noradrenalin		
	zugesetzte Menge	gefundene Menge	% wiedergefunden	zugesetzte Menge	gefundene Menge	% wiedergefunden
9	0,5 μg	0,38 μg	76	2,0 μg	1,76 μg	88
10	2,0 μg	1,71 μg	86	4,0 μg	3,6 μg	90
11	1,0 μg	0,90 μg	90	2,0 μg	2,28 μg	114
12	1,0 μg	0,90 μg	90	2,0 μg	1,95 μg	97
13	1,0 μg	0,85 μg	85	2,0 μg	1,14 μg	57
14	0,5 μg	0,40 μg	80	0,5 μg	0,30 μg	60
15	0,5 μg	0,40 μg	80	0,5 μg	0,32 μg	64
16	0,5 μg	0,43 μg	86	0,5 μg	0,28 μg	56

Wie aus der obigen Tabelle hervorgeht, zeigten die wiedergefundenen Adrenalinwerte eine geringere Streuung wie die dazugehörigen Noradrenalinwerte. Zu Überprüfung der letzteren haben wir daher bei den einzelnen Versuchen die Noradrenalinmengen unter Zugrundelegung der fluorometrisch bestimmten Adrenalinwerte und der Ergebnisse der Auswertung am Katzenblutdruck rechnerisch nach einer 2. Methode bestimmt.

2. Bestimmung des Noradrenalingehaltes aus dem fluorometrisch gefundenen Adrenalinwert und der Blutdrucksteigerung an der Katze.

Die Berechnung wurde nach der folgenden Formel durchgeführt: $N = NB—QA$.

N = Noradrenalin je Kubikzentimeter Vollblut in μg. NB = Blutdrucksteigerung je Kubikzentimeter Vollblut ausgedrückt in μg Noradrenalin, die den gleichen

Blutdruckeffekt hervorrufen. Q = Quotient blutdruckwirkungsgleicher Dosen von Noradrenalin zu Adrenalin. A = Fluorometrisch bestimmte Adrenalinmenge je Kubikzentimeter in μg.

3. Biologische Austestung an der Katze und am Hühnerblinddarm (rectal coecum) nach der Methode von Euler[6]. Für die Auswertung am Katzenblutdruck verwendeten wir kleine Tiere (1,5—2,5 kg), die ½ Std vor Beginn der Auswertung 0,5 mg Atropinsulfat und 0,25 mg Ergotamin-tartrat s.c. verabreicht erhielten. Beide Vagi wurden durchtrennt und der Blutdruck der A. carotis manometrisch registriert. Die durch die einzelnen Blutproben hervorgerufenen Blutdrucksteigerungen wurden mit den durch bekannte Noradrenalinmengen hervorgerufenen verglichen. Zu Beginn, sowie nach jeder 2. Testung wurde das Dosenverhältnis gleich blutdruckwirksamer Adrenalin- und Noradrenalindosen bestimmt. Bei der Testung am Hühnerblinddarm wurde eine Tyrode-Lösung der folgenden Zusammensetzung als Badeflüssigkeit verwendet (0,8% NaCl, 0,02% KCL, 0,0025% $MgCl_2$, 0,02% $CaCl_2$, 0,1% $NaHCO_2$, 0,005% NaH_3PO_4, 0,1% Glucose).

Die einzelnen Blutproben wurden hintereinander mit gleich wirksamen Dosen von Adrenalin verglichen und zwischendurch immer wieder das Dosenverhältnis gleichwirksamer Adrenalin- und Noradrenalinmengen bestimmt (im Mittelwert 60—80). Die Berechnung des Adrenalin- und Noradrenalingehaltes der einzelnen Blutproben erfolgte unter Verwendung der von Euler angegebenen Formel.

Ergebnisse.

Die Versuche wurden an 5 Tieren durchgeführt. Die Tab. 2—6 geben die mit den 3 verschiedenen Methoden gefundenen Adrenalin- und Noradrenalinwerte im Nebennierenvenenblut bei Ruhe und nach Hypothalamusreizung wieder.

Der in Spalte 7 dieser Tabellen unter der Überschrift Chrom. I angegebene Noradrenalinwert entspricht der nach chromatographischer Trennung fluorometrisch bestimmten Noradrenalinmenge. Die in Spalte 8 unter Chrom. II angegebenen Werte wurden nach Methode 2 aus dem chromatographisch bestimmten Adrenalin und der Blutdrucksteigerung an der Katze *errechnet*. Die in Spalte 11 angegebenen chromatographisch bestimmten Gesamtkatecholmengen wurden durch Summierung des chromatographisch bestimmten Adrenalinwertes mit dem Mittelwert der nach den Methoden 1 und 2 (Spalte 7 und 8) bestimmten Noradrenalinwerte berechnet. Die in Spalte 5 angegebenen Quotienten stellen das Verhältnis der chromatographisch bestimmten zu den biologisch gefundenen Adrenalinmengen dar, während in der Spalte 10 das Verhältnis des Mittelwertes der nach beiden chromatographischen Methoden erhaltenen Noradrenalinwerte (Spalte 7 und 8) zu den biologischen nach der Methode von Euler bestimmten wiedergegeben ist. Die in Spalte 13 und 14 angegebenen Methylierungsgrade wurden durch Division der entsprechenden Adrenalinwerte durch die in Spalte 11 und 12 angegebenen Gesamtkatecholwerte bestimmt.

Aus der zusammenfassenden Betrachtung aller 5 Versuche lassen sich nun folgende übereinstimmenden Feststellungen treffen.

Tabelle 2. *Versuch 1.* Katzengewicht: 3 kg; Reizfrequenz: 100 Hz.

Stromstärke des Reizes	Blutdruck mm Hg	NN-Durchfluß cm³/min	Adrenalin µg/min/kg			Noradrenalin µg/min/kg				Gesamt-Katechole µg/min/kg		Methylierung in %	
			Chromat.	Biologische Methode	Quotient Chrom/Biol.	Chrom. I	Chrom. II	Biologische Methode	Quotient Chrom/Biol.	Chrom.	Biologische Methode	Chrom.	Biologische Methode
A Ruhe	75	0,2	0,017	—	—	0,02	0,01	—	—	0,032	—	53	—
B 2 mA	75 auf 205	0,37	0,07	0,002	33	0,08	0,072	0,106	0,72	0,146	0,108	48	1,8
C 2 mA 8 min n. B	55 auf 145	0,75	0,041	0,0012	35	0,032	0,040	0,056	0,64	0,077	0,0572	53	2,1
D 2—8 mA 9 min n. C	45 auf 125	0,50	0,055	0,0023	23	0,062	0,103	0,125	0,66	0,138	0,127	40	1,8
E Ruhe 3 min n. D	40	0,05	0,03	—	—	0,014	—	—	—	0,044	—	68	—

Tabelle 3. *Versuch 2.* Katzengewicht: 3 kg; Reizfrequenz: 50 Hz.

			Adrenalin µg/min/kg			Noradrenalin µg/min/kg				Gesamt-Katechole µg/min/kg		Methylierung in %	
Stromstärke des Reizes	Blutdruck mm Hg	NN-Durchfluß cm³/min	Chromat.	Biologische Methode	Quotient Chrom/Biol.	Chrom. I	Chrom. II	Biologische Methode	Quotient Chrom/Biol.	Chrom.	Biologische Methode	Chrom.	Biologische Methode
A Ruhe	110	0,66	0,04	0,0037	12,5	0,082	0,062	0,08	0,9	0,112	0,083	35,7	4,5
B 4 mA	110 auf 220	1,44	0,087	0,014	6,2	0,52	0,32	0,3	1,4	0,507	0,314	17,5	4,7
C Ruhe 7 min n. B	60	0,28	0,011	0,0012	9,1	—	0,022	0,031	0,7	0,033	0,032	33	4
D 4—7 mA	60 auf 120	0,28	0,268	0,16	1,7	0,42	0,41	0,6	0,7	0,683	0,76	39	21

Tabelle 4. *Versuch 3.* Katzengewicht: 3,5 kg; Reizfrequenz: 50 Hz.

			Adrenalin µg/min/kg			Noradrenalin µg/min/kg				Gesamt-Katechole µg/min/kg		Methylierung in %	
Stromstärke des Reizes	Blutdruck mm Hg	NNB-Durchfluß cm³/min	Chromat.	Biologische Methode	Quotient Chrom/Biol.	Chrom. I	Chrom. II	Biologische Methode	Quotient Chrom/Biol.	Chrom.	Biologische Methode	Chrom.	Biologische Methode
A Ruhe	150	1,46	0,08	0,0022	35	—	0,045	0,06	0,75	0,125	0,062	64	3,6
B 2,7 mA	110 auf 150	1,6	—	0,005	—	—	—	0,06	—	—	0,065	—	9
C Ruhe 8 min n. B	110	1,4	0,076	0,011	6,9	0,108	0,05	0,064	1,15	0,15	0,075	50,5	15
D 4 mA	110 auf 190	2,2	0,18	0,042	4,3	0,19	—	0,11	1,7	0,37	0,15	48,5	28
E Ruhe 7 min n. D	100	1,0	0,057	0,01	5,7	0,08	0,01	0,045	1	0,102	0,055	56	18
F 4,1 mA	100 auf 220	2,4	0,19	0,086	2,4	0,22	0,08	0,19	0,8	0,34	0,276	56	31
G Ruhe 10 min n. F	80	0,67	—	0,069	—	—	—	0,034	—	—	0,040	—	17

Tabelle 5. *Versuch 4.* Katzengewicht: 3 kg; Reizfrequenz: 10 Hz.

			Adrenalin µg/min/kg			Noradrenalin µg/min/kg				Gesamt-Katechole µg/min/kg		Methylierung in %	
Stromstärke des Reizes	Blutdruck mm Hg	NNB-Durchfluß cm³/min	Chromat.	Biologische Methode	Quotient Chrom/Biol.	Chrom. I	Chrom. II	Biologische Methode	Quotient Chrom/Biol.	Chrom.	Biologische Methode	Chrom.	Biologische Methode
A Ruhe	120	3,6	0,13	—	—	0,157	—	—	—	0,287	—	45	—
B 2 mA	120 auf 145	1,6	0,05	0,0004	152	—	0,054	0,067	0,8	0,104	0,067	48	0,6
C Ruhe 12 min n. B	120	1,25	0,075	0,0023	33	0,058	0,060	0,068	0,87	0,134	0,071	56	3
D 6 mA	120 auf 160	1,8	0,08	—	—	0,25	0,12	—	—	0,26	—	31	—
E Ruhe 14 min n. D	120	1,3	0,1	—	—	0,056	—	—	—	0,156	—	64	—
F 8 mA	120 auf 175	2,4	0,11	0,0099	11	0,21	0,215	0,286	0,74	0,32	0,296	34	3,3
G Ruhe 23 min n. F	90	1,13	0,08	0,0056	13,5	—	0,08	0,100	0,8	0,16	0,107	50	5,5

Tabelle 6. *Versuch 5.* Katzengewicht: 3,1 kg; Reizfrequenz: 50 Hz.

Stromstärke des Reizes	Blutdruck mm Hg	NN-Durchfluß cm³/min	Adrenalin µg/min/kg			Noradrenalin µg/min/kg				Gesamt-Katechole µg/min/kg		Methylierung in %	
			Chromat.	Biologische Methode	Quotient Chrom/Biol.	Chrom. I	Chrom. II	Biologische Methode	Quotient Chrom/Biol.	Chrom.	Biologische Methode	Chrom.	Biologische Methode
A Ruhe	120	0,65	0,019	0,00084	21,8	—	0,016	0,018	0,9	0,035	0,019	54	4,4
B 4 mA	120 auf 200	0,73	0,064	0,0024	26	—	0,017	0,027	0,63	0,081	0,030	79	8
C Ruhe 9 min n. B	110	0,35	0,05	0,0037	13,5	0,012	0,009	0,023	0,46	0,061	0,027	82	14
D 4 mA	105 auf 145	0,35	0,032	0,0019	17	—	0,03	0,04	0,75	0,062	0,042	51	5
E 6—10 mA 1½ min nach D	80 auf 160	0,83	0,054	0,007	7,7	0,078	0,092	0,11	0,77	0,139	0,118	39	6,3
F Ruhe 6 min n. E	70	0,38	0,051	0,0068	7,5	0,060	0,060	0,074	0,81	0,111	0,081	46	8,5

1. Die nach chromatographischer Trennung mit der fluorometrischen Methode bestimmten Adrenalinmengen standen bei allen Versuchen sowohl unter Ruhe wie auch unter Reizbedingungen in einem starken Mißverhältnis zu den entsprechenden biologisch bestimmten Werten.

2. Dieses Mißverhältnis, welches sich in der Größe der Quotienten (Spalte 6 der Tabellen) ausdrückt, war zu Beginn aller Versuche am stärksten ausgeprägt und nahm unter den elektrischen Hypothalamusreizen mit fortschreitender Versuchsdauer ab. Während die chromatographisch gefundenen Werte zu Beginn des Versuches das 20—30fache der biologisch bestimmten Adrenalinmengen betrugen, nahm dieses Verhältnis im Verlauf einzelner Versuche bis auf Quotientenwerte von 7,5 bis 1,5 ab.

3. Die nach der Methode von Euler bestimmten Noradrenalinmengen lagen bei gleicher Größenordnung bei allen Proben durchschnittlich um ein Drittel bis ein Viertel höher als die entsprechenden Mittelwerte der nach den beiden chromatographisch bestimmten Methoden nachgewiesenen Noradrenalinmengen.

4. Die fluorometrisch bestimmten Noradrenalinmengen waren durchwegs in der gleichen Größenordnung wie die aus den fluorometrisch bestimmten Adrenalinwerten und der Blutdrucksteigerung an der Katze errechneten Noradrenalinwerte und stimmten vielfach sogar ausgezeichnet überein.

5. Der nach elektrischer Hypothalamusreizung chromatographisch und fluorometrisch bestimmte Gesamtkatecholgehalt des Nebennierenvenenblutes wies unabhängig von der angewandten Reizfrequenz und ohne erkennbare Abhängigkeit von der verwendeten Reizstromstärke bei allen Versuchen eine Vermehrung um das 2—6fache des Ruhegehaltes auf. Hierbei zeigten die zwischen den einzelnen Reizperioden 5—10 min nach Aufhören des Reizes abgenommenen Ruhewerte stets ein Zurückgehen des Gesamtkatecholgehaltes auf Werte, die in der Größenordnung des Ruhewertes lagen.

6. Der Methylierungsgrad, der bei den 5 Ruhewerten im Durchschnitt 50,1% betrug, stieg nur bei einem der 13 Reizversuche über den Ruhewert an (Versuch 5 B). Bei 3 Reizen blieb er unverändert, bei den 9 übrigen kam es jedoch zum Absinken des Adrenalingehaltes unter den Ruhewert, so daß der Mittelwert aus allen 13 Reizversuchen 44,9% betrug.

7. Der nach der Methode von Euler bestimmte Methylierungsgrad betrug für die Ruhewerte im Durchschnitt 4,1% und stieg während der Reizung in der Regel auf höhere Werte an.

Diskussion.

Für die Beurteilung der in unseren Versuchen erzielten Ergebnisse muß vor allem die Verläßlichkeit der verschiedenen angewandten Methoden einer eingehenden Wertung unterzogen werden. Hier steht zunächst die Tatsache im Vordergrund, daß die mit der Methode nach v. Euler gefundenen Adrenalinwerte und damit der Methylierungsgrad im krassen Mißverhältnis zu den Ergebnissen der fluorometrischen Methode stehen, während dies bei dem entsprechenden Vergleich der mit den beiden Methoden gefundenen Noradrenalinwerte nicht der Fall ist. Die Blutdrucksteigerung an der Katze wurde infolge der höheren pressorischen Wirksamkeit von Noradrenalin zu einem großen Teil durch den Gehalt dieses Amines in den Testproben verursacht. Der Adrenalinwert jedoch beruht infolge der 50—100fach stärkeren darmerschlaffenden Wirkung dieses Katechols zur Hauptsache auf den Ergebnissen der Testung am Hühnerdarm. Es folgt daraus, daß der Hauptgrund der Abweichungen beider Methoden in der Auswertung am Hühnerdarm zu suchen ist. Außerdem ergab die Kombination der Auswertung am Katzenblutdruck mit den chromatographisch und fluorometrisch bestimmten Adrenalinwerten zur Berechnung des Noradrenalingehaltes eine sehr gute Übereinstimmung mit den direkt chromatographisch und fluorometrisch bestimmten Noradrenalinwerten. Die am Katzenblutdruck bestimmten Katecholwerte stimmten also mit den Ergebnissen der chemischen Bestimmungsmethode gut überein, während dies bei der Austestung am Hühnerblinddarm nicht der Fall war. Ganz besonders stark trat diese Erscheinung bei den Ruhewerten zutage, bei denen die am Hühnerblinddarm bestimmten Absolutmengen von Adrenalin unverhältnismäßig niedrig waren. Die Tatsache jedoch, daß nach wiederholten Reizungen die am Hühnerdarm bestimmten Adrenalinwerte im Verhältnis zu den chromatographisch nachgewiesenen stärker anstiegen und in manchen Versuchen diese sogar bis zur Hälfte erreichten, legt die Vermutung nahe, daß die biologische Wirksamkeit des aus den Nebennieren abgeschiedenen Inkretes auf den Hühnerblinddarm unter den Versuchsbedingungen im Laufe des Versuches eine Änderung erfahren hat.

Ob dabei Adrenalin unter den Ruhebedingungen in einer gebundenen darminaktiven Form abgeschieden oder durch gleichzeitige Mitausschüttung eines die Adrenalinwirkung am Darm aufhebenden Stoffes in seiner Wirkung herabgesetzt wurde, können wir aus unseren Versuchen nicht entscheiden. In dem einen Falle müßte durch die chemische Aufarbeitung eine Spaltung und Freisetzung von aktivem Adrenalin, in dem 2. Falle eine Abtrennung des inaktivierenden Stoffes durch die chromatographische Trennung erfolgt sein. Wir halten die erste Möglichkeit für unwahrscheinlicher, da bei einer Annahme der Ausscheidung von gebundenem „Adrenalin“ nach unseren Befunden die pressorische Wirksamkeit dieses am Darm inaktiven Adrenalins voll erhalten sein müßte. Diese Annahme

steht im Widerspruch mit den bisherigen Erfahrungen über solche biologisch unwirksamen Vorstufen. Hingegen könnten zur Unterstützung der 2. Annahme Beobachtungen von M. Vogt[20] herangezogen werden, wonach natives Plasma öfters die Eigenschaft zeigt, die Adrenalinwirkung auf den Rattenuterus zu maskieren. Auch hier wurden Substanzen angenommen, die die Uteruswirkung des Adrenalins aufzuheben imstande sind. Die Tatsache, daß unter den Bedingungen der elektrischen Hypothalamusreizung bzw. bei Abfall des Blutdruckes gegen Ende des Versuches relativ mehr Adrenalin gefunden wurde, kann nun leicht damit erklärt werden, daß die durch die Reizung bzw. das Sinken des Blutdruckes bedingte Mehrausschüttung an Katecholen nicht mit einer gleichzeitigen Mehrausschüttung dieses hypothetischen darminaktivierenden Stoffes einherging.

Beim Studium der wichtigsten bisher auf diesem Gebiete sowohl mit der Methode nach v. Euler wie auch mit der chromatographischen Trennung durchgeführten Arbeiten, konnten wir feststellen, daß unter den üblichen Reizbedingungen (Acetylcholin, KCl, elektrische Splanchnicus-Reizung) in allen Arbeiten mit beiden Methoden eine mehr oder weniger starke Vermehrung des Katecholgehaltes im Nebennierenvenenblut festgestellt worden war. Während jedoch die Autoren, die mit der chromatographischen Trennung arbeiteten, im allgemeinen keine oder nur eine schwache Verschiebung des Methylierungsgrades nach den oben erwähnten Reizbedingungen beobachten konnten, wurden in den Arbeiten mit der Katzenblutdruck-Hühnerblinddarmmethode nach Splanchnicus-Reizung sowie nach zentraler Hypothalamusreizung stets beträchtliche Steigerungen im Methylierungsgrad der im Nebennierenvenenblut nachgewiesenen Katecholamine beobachtet. In Übereinstimmung damit zeigen auch die von allen Autoren gefundenen Ruhewerte, soweit sie überhaupt bestimmbar waren, erhebliche Unterschiede.

Tabelle 7. *Mittelwerte aus verschiedenen Ruheversuchen.*

Autoren	Adrenalin			Noradrenalin			
	μg/cm³ Plasma	μg/cm³ Vollblut	μg/min	μg/cm³ Plasma	μg/cm³ Vollblut	μg/min	% Meth.
Unsere chrom. Werte . . .	0,264	0,168	0,180	0,268	0,174	0,188	50,3
Unsere biol. Werte	0,0135	0,0088	0,0077	0,309	0,201	0,1717	4,1
M. Vogt[14] Chrom. Werte .	—	—	0,014	—	—	0,022	46,0
P. Holtz[19] Biol. Werte . .	0,092	0,060	0,048	0,287	0,187	0,151	22,5
Euler-Kaindl[18] Biologische Werte	—	—	0,040	—	—	0,150	25
Brücke u. Mitarb.[13] Biologische Werte	—	—	0,054	—	—	0,777	10,5

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß der bei uns in der Ruhe mit der chromatischen Methode im Nebennierenvenenblut gefundene Methylierungsgrad der Katecholamine (50,3%) gut mit dem von M. Vogt[20] bei der Ruhesekretion denervierter Nebennieren bestimmten Wert (46,0%) übereinstimmt.

Daß hierbei die von M. Vogt bestimmten Absolutmengen wesentlich niedriger als die von uns nachgewiesenen sind, hängt wohl mit der Tatsache der chronischen Denervierung zusammen, nachdem Stuart u. Rogoff[19] seinerzeit mit einer unempfindlicheren Nachweismethode festgestellt hatten, daß die Adrenalinsekretion der Nebennieren nach chronischer Denervierung vollkommen zum Stillstand kommt. In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Outschoorn[18] sind leider die in der Ruhesekretion sezernierten Adrenalin- und Noradrenalinmengen nur annähernd bestimmbar gewesen, so daß kein genauer Vergleich durchgeführt werden kann. Wesentlich niedriegere Methylierungsgrade wurden jedoch im Ruheblut von allen Autoren mit der biologischen Methode nach v. Euler gefunden. Hierbei muß allerdings festgestellt werden, daß wir mit der Methode des Hühnerblinddarms niederere Werte als v. Euler u. Kaindl[14] gefunden haben, was auch in geringerem Maße für unsere früheren Arbeiten gilt. Auch Holtz[12] fand mit der Methode nach v. Euler, allerdings unter Verwendung des Kückenblinddarms, deutlich höhere Werte für Adrenalin als wir.

Die geschilderten Verhältnisse erschweren die Entscheidung der Frage, ob tatsächlich bei zentraler Reizung, wie wir dies früher gesehen haben, oder bei Splanchnicus-Reizung, wie dies Holtz[12] beschreibt, der Methylierungsgrad sich gegenüber der Ruhe verändert. Lund[17] konnte bei Anwendung seines fluorometrischen Verfahrens keine Veränderungen im Katecholverhältnis nach Splanchnicusreizung finden, während Outschoorn[18] in seiner letzten Arbeit über eine vermehrte Ausschüttung von Adrenalin nach Splanchnicus-Reizung berichtet. In der vorliegenden Arbeit konnten wir bei der Bestimmung mit der fluorometrischen Methode nach vorheriger chromatographischer Trennung der Katechole keine Vermehrung des Adrenalingehaltes nach elektrischer Hypothalamusreizung nachweisen. Bei einer durchschnittlichen Erhöhung des Katecholgehaltes im Nebennierenvenenblut nach elektrischer Reizung um das 4—7fache war eher eine Abnahme des Mathylierungsgrades festzustellen. Dies ist vor allem aus dem Mittelwert aus den 13 Reizversuchen ersichtlich, der um 5,4% niedriger als der dazugehörige Mittelwert aus den 5 Ruheversuchen war.

Zusammenfassung.

1. Durch Kombination der papierchromatographischen Trennung und der fluorometrischen Messung wurde eine neue Nachweismethode von Adrenalin und Noradrenalin im Nebennierenvenenblut ausgearbeitet.

2. Die mit der fluorometrischen Methode in der Ruhe und bei Hypothalamusreizung bestimmten Werte für Adrenalin wichen stark von jenen ab, die unter gleichen Bedingungen biologisch bestimmt wurden. Hierzu wurde der Vergleich der Wirkungen am „Hühnerblinddarm“ und am Katzenblutdruck verwendet.

3. Die Unterschiede der nach beiden Methoden gefundenen Adrenalinwerte waren in den Ruheversuchen am stärksten ausgeprägt und nahmen unter den elektrischen Reizen im weiteren Verlauf der Versuche ab.

4. Zum Unterschied von Adrenalin zeigten die nach beiden Methoden bestimmten Noradrenalinwerte nur geringe Abweichungen. Dabei wurde unabhängig von den Reizbedingungen mit der biologischen Methode durchschnittlich um 25—35% mehr Noradrenalin gefunden.

5. Der nach der fluorometrischen Methode bestimmte Gesamtkatecholgehalt des Nebennierenvenenblutes zeigte unter elektrischer Hypothalamusreizung in allen Versuchen eine Vermehrung um das 3—7fache.

6. Der Methylierungsgrad der Kathecholamine im Nebennierenvenenblut betrug bei fluorometrischer Bestimmung in der Ruhe im Durchschnitt 50,3%. Der durchschnittliche Methylierungsgrad aus den 13 Reizversuchen wurde gegenüber dem Ruhewert um 5,4% erniedrigt gefunden.

Literatur.

[1] Brauner, F., F. Brücke, F. Kaindl et A. Neumayr: Arch. internat. Pharmacodynamie **83**, 505 (1950). — [2] Brauner, F., F. Brücke, F. Kaindl et A. Neumayr: Arch. internat. Pharmacodynamie **85**, 419 (1951). — [3] Brücke, F., F. Kaindl et H. Mayer: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 407 (1952). — [4] Bülbring, E., and J. H. Burn: Brit. J. Pharmacol. **4**, 202 (1949). — [5] Crawford, T., and A. Outschoorn: Brit. J. Pharmacol. **6**, 8 (1951). — [6] v. Euler, U. S: Acta physiol. scand. **19**, 207 (1949). — [7] v. Euler, U. S., and U. Amberg: Nature (Lond.) **163**, 642 (1949). — [8] Gaddum, J. H., and F. Lembeck: Brit. J. Pharmacol. **4**, 401 (1949). — [9] Goldenberg, M., M. Faber, E. J. Aston and E. C. Chargoff: Science (Lancaster, Pa.) **109**, 534 (1949). — [10] Holtz, P., K. Kredner u. G. Kroneberg: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 228 (1947). — [11] Holtz, P., u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 484 (1949). — [12] Holtz, P., A. Engelhardt, K. Greeff u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 58 (1952). — [13] James, W. O.: Nature (Lond.) **161**, 851 (1948). — [14] Kaindl, F., and U. S. v. Euler: Amer. J. Physiol. **166**, 284 (1951). — [15] Lund, A.: Acta pharmac. tox., K'hvn. **5**, 231 (1949). — [16] Lund, A.: Acta pharmac. tox., K'hvn. **6**, 137 (1950). — [17] Lund, A.: Acta pharmac. tox., K'hvn. **7**, 309 (1951). — [18] Outschoorn, A.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 605 (1952). — [19] Steward, G. N., and J. M. Rogoff: J. of Pharmacol. **8**, 479 (1916). — [20] Vogt, M.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 325 (1952).

Prof. Dr. F. Brücke, Pharmakol. Institut der Universität Wien, Österreich.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 185—191 (1953).

Aus der pharmakologischen Abteilung, Karolinska Institutet,
und der physiologischen Abteilung, Veterinärhögskolan, Stockholm.

Wirkung von Alkohol, Aceton, Äther und Chloroform auf die Chemoceptoren des Glomus caroticum*.

Von
S. Landgren, G. Liljestrand und Y. Zotterman.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. März 1953.)

In früheren Arbeiten wurde über Erfahrungen berichtet, die dafür sprechen, daß Acetylcholin eine ähnliche Rolle als chemischer Überträgerstoff im Glomus caroticum spielt wie in den autonomen Ganglien. Diese Auffassung wurde durch die folgenden Befunde gestützt. Lokale Applikation einer 0,1—0,2%igen Lösung von Physostigminsalicylat beiderseits auf das Glomus verstärkte den stimulierenden Effekt von Sauerstoffmangel, bzw. Kohlendioxydanhäufung auf die Atmung, während entsprechende Behandlung mit einer 1%igen Lösung von Atropinsulfat die atmungserregende Wirkung von Sauerstoffmangel oder Lobelinsulfat verminderte oder sogar vollständig aufhob (Liljestrand, 1951). In Versuchen von Landgren, Liljestrand u. Zotterman (1952) zeigte sich ferner, daß direkte intracarotidale Injektion durch die Arteria thyreoidea geeigneter Mengen von Substanzen, welche die Cholinesterasen hemmen, wie Physostigmin, Prostigmin, DFP, TEPP, Ergotamin, Morphin oder Fluoride, die „chemischen" Aktionspotentiale des Sinusnerven wesentlich verstärken, während umgekehrt solche Stoffe, die als Antagonisten des Acetylcholins betrachtet werden, wie Atropin, D-Tubocurarin, Tetraäthylammonium oder Decamethonium, die betreffenden Potentiale vermindern oder gänzlich beseitigen können. Im Anschluß an die Arbeiten von Gesell u. Mitarb. (1942) wurde ferner versucht, die physiologischen Reize der Chemoceptoren (Sauerstoffmangel, Kohlendioxydanhäufung) unter demselben Gesichtspunkte zu erklären. Dabei wurde angenommen, daß sie die Reaktion innerhalb der Glomuszellen in saurer Richtung verschieben; dadurch soll die Hydrolyse des Acetylcholins herabgesetzt und die Konzentration des Stoffes erhöht werden. Die intravenöse oder intracarotidale Injektion kleiner Mengen Ammoniak, bzw. Natriumcarbonat bewirkte in Übereinstimmung mit dieser Annahme kurzdauerndes Verschwinden der chemischen Potentiale (Euler, Liljestrand u. Zottermann, 1939; Landgren, Liljestrand u. Zotterman, 1952).

* Otto Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

Wenn die hier angedeutete Erklärung des Reizmechanismus der Chemoceptoren richtig ist, wäre zu erwarten, daß zahlreiche andere Stoffe, für welche eine Hemmung der Cholinesterasen in vitro nachgewiesen wurde, ebenfalls die Aktivität der Chemoceptoren im Glomus caroticum, bzw. Glomus aorticum verstärken können.

Zu diesen Substanzen gehören gewisse einfache Alkohole und Narkotica der Fettreihe.

Plattner u. Galehr fanden (1928) eine 40—60%ige Hemmung der Cholinesterase aus Erythrozyten bei einer 0,8 molaren Konzentration des Äthylalkohols. Für Propyl-, Butyl- und Amylalkohole waren die entsprechenden Werte 0,4, 0,15 und 0,045 molar. Aceton war etwa 2—3mal wirksamer als Äthylalkohol. Bernheim u. Bernheim beobachteten (1936) eine Verdoppelung der zur Hydrolyse des Acetylcholins durch Gehirnesterase erforderlichen Zeit durch Zusatz von 0,003 molar Chloroform, 0,33 molar Äther oder 2,1 molar Äthylalkohol. Nach Heim u. Fahr (1940) soll allerdings Äthylalkohol bis zu einem Gehalt von 0,25% die Spaltung des Acetylcholins beschleunigen und erst bei noch höherer Konzentration Hemmung geben. In entsprechender Weise verhielt sich in ihren Versuchen Urethan. Weder bei der Nachprüfung von Genuit u. Labenz (1941) noch in der von Ammon (1943) konnte indessen die Beschleunigung der Hydrolyse des Acetylcholins bei niedrigen Konzentrationen der erwähnten Stoffe bestätigt werden. Genuit u. Labenz wiesen eine beginnende Hemmung durch Äthylalkohol schon bei einem Gehalt von nur 1:30000 nach. Bei 1% Alkohol betrug die Hemmung 40—60%. Amylalkohol wirkte etwa 3—10mal stärker. Nach Torda (1943) bewirkte Chloroform schon in Konzentration von 0,01 Volumenprozent an eine Hemmung der Cholinesterase aus der Katzenmuskulatur. Äther hat ähnliche, aber nur etwa $^1/_{40}$ so starke Hemmungswirkung.

Aus den angeführten Arbeiten geht deutlich hervor, daß verschiedene Alkohole, Aceton, Äther und Chloroform, eine Hemmungswirkung auf Cholinesterasen ausüben, und zwar in Konzentrationen, die unter Umständen im Organismus hervorgerufen werden können.

Methodik.

Sämtliche Versuche wurden an Katzen ausgeführt, die mit Chloralose (0,07 g pro kg) und Urethan (0,25 g pro kg) narkotisiert waren. Der Sinusnerv wurde in früher angegebener Weise (Jarisch, Landgren, Neil u. Zotterman, 1952) präpariert und die Aktionspotentiale wie dort abgeleitet. Der Blutdruck wurde aus der Carotis externa der präparierten Seite geschrieben. Die zu prüfenden Substanzen wurden durch eine Kanüle in der Arteria thyreoidea oder einer kleinen Muskelarterie der Carotis communis gespritzt, und zwar immer mit Ringerlösung verdünnt. Die Tiere wurden durch künstliche Atmung mit Luft oder verschiedenen Gasgemischen ventiliert.

Bei der Deutung der Befunde ist zu beachten, daß die „chemischen" Potentiale eine relativ kleine Amplitude haben, daß aber solche ebenfalls bei Reizung von Baroceptoren durch Erhöhung des intracarotidalen Druckes (neben größeren) hervorgerufen werden können (vgl. Euler, Liljestrand u. Zotterman, 1941, Landgren, 1952). Beim Studium der Chemoceptoren unter Einwirkung eines Stoffes vergleicht man deshalb am besten die Potentiale vor und nach Injektion des betreffenden Stoffes bei konstantem Blutdruck.

Wichtig ist auch, daß die intracarotidale Injektion einer RINGERlösung zuerst eine Abnahme der chemischen Potentiale bewirkt (vgl. Abb. 2, sowie LANDGREN, LILJESTRAND u. ZOTTERMAN, 1952). Zum Teil scheint dies eine Folge der Abkühlung des Glomus zu sein (WITZLEB, 1952), daneben spielen sicher auch andere Momente eine Rolle.

Ergebnisse.

Wenn eine Katze mit Sauerstoff künstlich beatmet wird, so daß die chemischen Potentiale im Sinusnerven fast vollständig verschwunden sind, bewirkt die intracarotidale Einspritzung von 1 ml 7,6%igem Äthylalkohol schnell das Auftreten zahlreicher chemischer Impulse (Abb. 1). Die Wirkung ist gewöhnlich schon während der Injektion

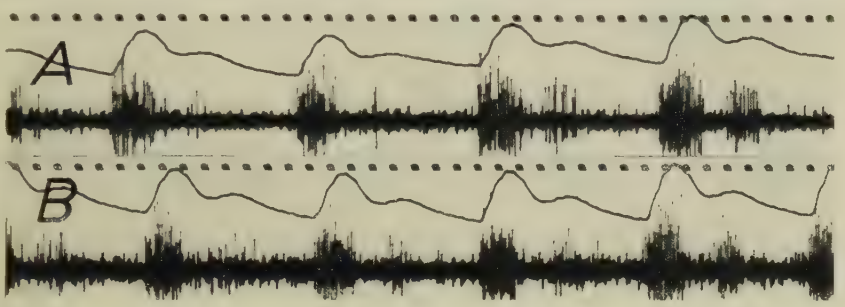


Abb. 1. Künstliche Atmung mit Sauerstoff. *A* vor und *B* 11 sec nach der intracarotidalen Injektion von 1 ml 7,6%iger Äthylalkohollösung. Zwischen den Zeitmarken in sämtlichen Abbildungen $^1/_{25}$ sec.

nachweisbar, erreicht ihr Maximum in 10—15 sec und klingt dann allmählich im Laufe einer halben bis einigen Minuten ab. Die Potentiale sind von etwa demselben Umfang wie nach mäßigem bis kräftigem Sauerstoffmangel. Wird das Tier statt mit Sauerstoff mit Luft beatmet, so werden die normalen chemischen Impulse durch Äthylalkohol wesentlich verstärkt, und man kann gleichzeitig feststellen, daß keine Lähmung vorausgeht. Dies steht in gewissem Gegensatze zu den Baroceptorimpulsen, die etwa ¼ min nach der Injektion zum großen Teil verschwinden können (vgl. LILJESTRAND, 1953). Verwendet man für die Injektion 1 ml 3,8%igen Äthylalkohol, erhält man eine deutliche, aber schwächere Wirkung, und sogar nach 1 ml 1,8%igen kann man sie spüren. Ähnliche Ergebnisse wie mit Äthylalkohol wurden mit einigen höheren Alkoholen erhalten, die Wirkung war aber stärker, wie man auch erwarten konnte. Deutliche Verstärkung der chemischen Potentiale trat nämlich nach 1 ml 1%igen Propylalkohol, bzw. 0,4%igen Butyl- oder 0,2%igen Amylalkohol auf. Dasselbe konnte nach derselben Menge 5—10%igen Aceton, 2—4%igen Äther oder 0,5%igen Chloroform beobachtet werden. Für die Chloroformwirkung war charakteristisch, daß sie ziemlich lange anhielt, oft 20—30 min.

Um den Mechanismus der Wirkung der erwähnten Stoffe auf die Chemoceptoren näher zu verfolgen wurde untersucht, ob einige der eingangs erwähnten Pharmaka den Verlauf beeinflussen konnten. Versuche wurden sowohl mit Alkohol als mit Chloroform ausgeführt. Während aber die kurze Dauer der Alkoholwirkung einen Vergleich zwischen Versuchen mit Alkohol allein und solchen, wo die Alkoholinjektion von einer Einspritzung der zu prüfenden Substanz gefolgt wurde, benötigte,

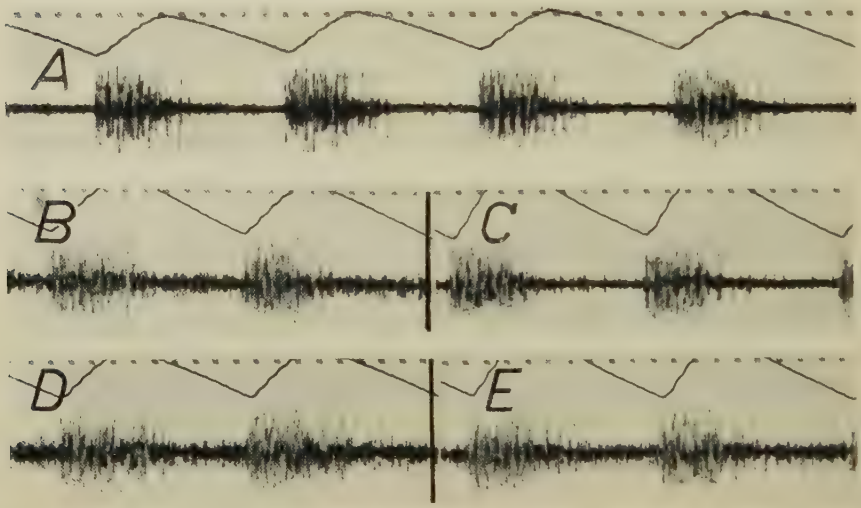


Abb. 2. Künstliche Atmung mit Sauerstoff. Mittlerer Blutdruck unverändert 140–145 mm. *A* Kontrolle. *B* und *D* 3 min nach intracarotidaler Injektion von 1 ml 0,5%iger Chloroformlösung. *C* Unmittelbare Fortsetzung von *B*, 1 sec nach 1 ml 0,05 N Ammoniaklösung. *E* Unmittelbar nach *D*, 1 sec nach 1 ml Ringer-Lösung.

eignet sich Chloroform besonders gut zu diesen Experimenten wegen der anhaltenden Wirkung. Prinzipiell wurden aber dieselben Ergebnisse mit Äthylalkohol und mit Chloroform erhalten.

Abb. 2 illustriert, daß 1 ml Chloroformlösung (0,5%) die chemischen Potentiale auch bei Sauerstoffatmung auslöst. 1 sec nach der Injektion von 1 ml 0,05 N Ammoniaklösung sind sie aber verschwunden, um bald wieder zurückzukehren. Ein Kontrollversuch zeigt, daß Ringerlösung allein eine wesentlich kleinere Reduktion der Ausschläge bewirkte. Die intracarotidale Injektion von 2 mg Atropinsulfat vermindert ebenfalls die nach Chloroform auftretenden Potentiale sehr wesentlich (Abb. 3). Dies war auch der Fall nach 0,3 mg D-Tubocurarin (Abb. 4). Die Injektion von 2 mg Hexamethonium, während das Tier mit 5% Sauerstoff beatmet wurde, führte zu einer sehr kräftigen Reduktion der chemischen Potentiale (Abb. 5). Das Hexamethonium verhält sich also in dieser Hinsicht genau wie Decamethonium (Landgren, Liljestrand and

Zotterman, 1952). Douglas hat gezeigt (1952), daß Hexamethonium in Dosen, die die glomuserregende Wirkung von Nicotin, Lobelin oder Acetylcholin aufheben, nicht den Effekt von Anoxie, Cyaniden oder

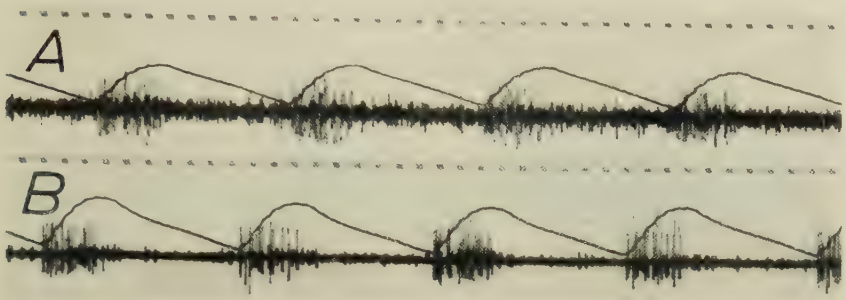


Abb. 3. Künstliche Atmung mit Sauerstoff. Blutdruck unverändert 100 mm. *A* Nach 1 ml 0,5% iger Chloroformlösung. *B* Fortsetzung von *A* aber unmittelbar nach beendigter Injektion von 2 mg Atropinsulfat.

Kaliumionen beeinflußt. Er hebt aber hervor, daß Hexamethonium nicht leicht in die Zelle eintritt. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß der Unterschied nicht prinzipieller Natur, sondern einfach darauf zurück-

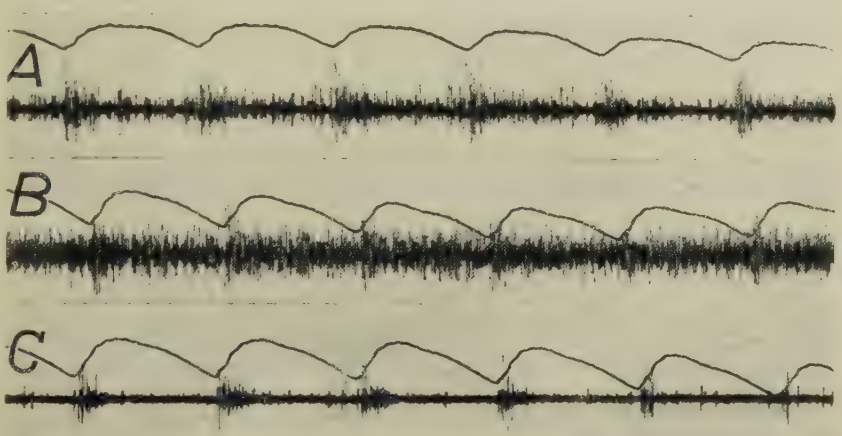


Abb. 4. Künstliche Atmung mit Sauerstoff. *A* Kontrolle. Blutdruck 130 mm. *B* Nach 1 ml 0,5%iger Chloroformlösung. Blutdruck 120 mm. *C* Direkte Fortsetzung von *B*, aber 15 sec nach 0,33 mg D-Tubocurarinhydrochlorid.

zuführen ist, daß es bei einem intracellularen Angriffspunkt im Glomus viel leichter sein muß, von außen zugeführte Substanzen zu blockieren als die innerhalb der Zellen entstandenen Reize. Ähnliches gilt für zahlreiche andere Substanzen (vgl. Landgren, Liljestrand u. Zotterman, 1952). Abb. 5 zeigt, daß bei angemessener Dosis und Applikationsweise

auch die Antwort der Chemoceptoren des Glomus auf Anoxie ausbleibt. Genau in derselben Weise verhält sich auch Chloroform (Abb. 6).

Es hat sich also herausgestellt, daß Alkohole, Aceton, Äther und Chloroform eine Verstärkung der chemischen Aktionspotentiale des Sinusnerven hervorrufen, und daß diese Wirkung nicht nur von Atropin,

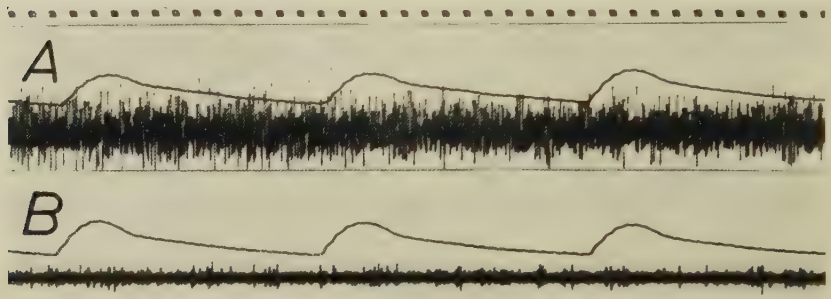


Abb. 5. Künstliche Atmung mit 5% Sauerstoff. Blutdruck 40 mm. *A* Kontrolle. *B* Nach 2 mg Hexamethonium.

Curarin und Decamethonium, die Antagonisten des Acetylcholins sind, sondern auch von Ammoniak reduziert oder aufgehoben werden kann. Die Potentiale bieten also eine weitgehende Analogie mit denjenigen, die nach Sauerstoffmangel auftreten. Dies stimmt gut mit der Hypothese überein,

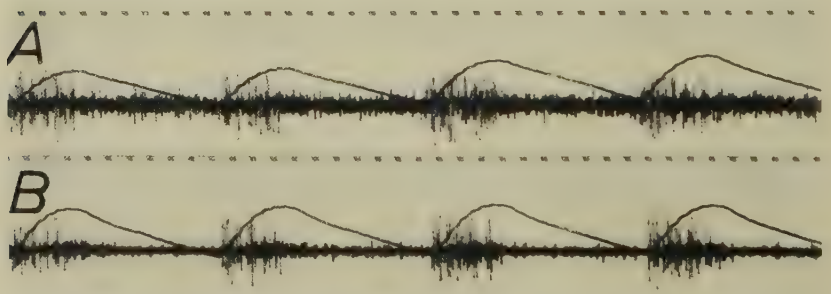


Abb. 6. Künstliche Atmung mit Sauerstoff. Blutdruck 100 mm. *A* Nach 1 ml 0,5%iger Chloroformlösung. *B* Direkte Fortsetzung von *A*, aber nach 2 mg Hexamethonium.

daß Acetylcholin eine Rolle als Überträgerstoff im Glomus caroticum spielt, und daß die hier geprüften narkotischen Substanzen ihre erregende Wirkung auf das Glomus einer Hemmung der Cholinesterasen verdanken.

Der atmungssteigernde Effekt des Äthylalkohols ist lange Zeit Gegenstand einer lebhaften Diskussion gewesen, vor allem weil es schwierig erschien, ihn mit der Lehre von Bunge (1887) und Schmiedeberg (1906) in Übereinstimmung zu bringen, wonach Alkohol auf das Zentralnervensystem nur eine lähmende Wirkung ausübt und die Erregungen aus-

schließlich auf den Fortfall von Hemmungen zurückgeführt werden. In bezug auf die nach Alkohol vorkommende Steigerung der Respiration meint Schmiedeberg, daß der Alkohol wohl „eine lokale Reizung, nirgends aber eine spezifische Erregung nervöser Funktionsgebilde" verursacht. Es ist aber nun mit Sicherheit bekannt, daß die atmungserregende Wirkung des Alkohols an die gesteigerte Funktion der Chemoceptoren im Glomus caroticum und Glomus aorticum geknüpft ist (Liljestrand, 1953). Durch die hier mitgeteilten Beobachtungen wird gezeigt, daß es sich vermutlich um die Hemmung eines enzymatischen Vorganges handelt. Es ist höchst wahrscheinlich, daß eine eingehende Analyse zeigen wird, daß in vielen Fällen Erregung durch Eingreifen in enzymatischen Gleichgewichten zustande kommt, wie dies zuerst für Physostigmin durch die klassische Arbeit von Loewi u. Navratil (1926) gezeigt wurde.

Zusammenfassung.

Intracarotidale Einspritzung von Alkohol, Aceton, Äther oder Chloroform in Ringerlösung bewirkt eine Verstärkung der von den Chemoceptoren ausgelösten Aktionspotentiale des Sinusnerven. Da alle diese Substanzen in vitro einen hemmenden Einfluß auf die Cholinesterasen ausüben und Acetylcholin wahrscheinlich eine Rolle als Überträgerstoff im Glomus caroticum spielt, wurde geprüft, wie sich die erwähnte Wirkung durch verschiedene Pharmaka modifizieren läßt. Es stellte sich heraus, daß sowohl durch Atropin, D-Tubocurarin und Hexamethonium als auch durch Ammoniak die Potentiale vermindert oder ausgelöscht werden konnten. Diese Befunde sprechen für die Annahme, daß die betreffenden Narkotica durch Hemmung der Cholinesterasen eine Zunahme des chemischen Impulsverkehrs im Glomus hervorrufen.

Literatur.

Ammon, R.: Erg. Enzymforschg **9**, 35 (1943). — Bernheim, F., and M. L. C. Bernheim: J. of Pharmacol. **57**, 427 (1936). — v. Bunge, G.: Die Alkoholfrage. Leipzig 1887. — Douglas, W. W.: J. of Physiol. **118**, 373 (1952). — v. Euler, U. S., G. Liljestrand u. Y. Zotterman: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **83**, 132 (1939). — Acta physiol. Scand. **2**, 1 (1941). — Genuit, H., u. K. Labenz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **198**, 369 (1941). — Gesell, R., C. R. Brassfield and M. A. Hamilton: Amer. J. Physiol. **136**, 604 (1942). — Heim, F., u. A. Fahr: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **195**, 59 (1940). — Jarisch, A., S. Landgren, E. Neil u. Y. Zotterman: Acta physiol. Scand. **25**, 195 (1952). — Landgren, S.: Acta physiol. Scand. **26**, 1 (1952). — Landgren, S., G. Liljestrand u. Y. Zotterman: Acta physiol. Scand. **26**, 264 (1952). — Liljestrand, G.: Acta physiol. Scand. **24**, 225 (1951); **29** [im Druck] (1953). — Loewi, O., u. E. Navratil: Arch. Physiol., Bonn **214**, 689 (1926). — Plattner, F., u. O. Galehr: Arch. Physiol., Bonn **220**, 606 (1928). — Schmiedeberg, O.: Grundriß der Pharmakologie, 5. Aufl. Leipzig 1906. — Thorda, C.: J. of Pharmacol. **77**, 50 (1943). — Witzleb, E.: Arch. Physiol., Bonn **255**, 181 (1952).

Prof. Dr. G. Liljestrand, Karolinska Institutet Stockholm, Schweden.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 192—196 (1953).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Istanbul.

Chemoreceptoren-Reizstoffe und Blut/Hirn-Schranke*.

Von

HANS WINTERSTEIN und NURAN GÖKHAN.

(Eingegangen am 2. März 1953.)

Bei unseren Untersuchungen über die Ammoniumchlorid-Acidose [5, 6] haben wir festgestellt, daß Änderungen der cH im Blut die Atemzentren reflektorisch auf dem Wege der Chemoreceptoren beeinflussen, daß dagegen eine direkte Wirkung auf die Zentren nur auf dem Wege über den Liquor, d. h. nach Passage der Blut/Liquor/Hirn-Schranke möglich ist. Denn die Einführung geeigneter Dosen von NH_4Cl, die die Reaktion des Blutes nach der saueren, jene des Liquors dagegen nach der alkalischen Seite verschieben, bewirkt normalerweise durch das Überwiegen der Chemoreceptoren-Reizung eine Atmungsverstärkung, nach Ausschaltung der Glomera carotica aber eine Atmungsschwächung. Nun gibt es eine Reihe von Stoffen, wie Lobelin, Cyanide u. a. m., deren atmungerregende Wirkung nach der vielfach bestätigten Entdeckung von HEYMANS u. Mitarb.[3] so gut wie ausschließlich auf dem Wege der Chemoreceptoren zustande kommt und nach Ausschaltung der Carotisnerven unwirksam bleibt. Sie verhalten sich also ganz ähnlich wie nach unseren Befunden die Wasserstoff-Ionen des Blutes in der Ammoniumchlorid-Acidose. Es lag daher der Gedanke nahe, daß bei all diesen Stoffen die Ursache ihres Verhaltens in der Blut/Hirn-Schranke zu suchen sei, und daß die nach Chemoreceptoren-Ausschaltung unwirksamen Stoffe wirksam werden müßten, wenn man sie durch *Suboccipitalinjektion* direkt in den Liquor des vierten Ventrikels einführt. Die folgenden Beobachtungen zeigen, daß dies tatsächlich der Fall ist.

1. Ammoniumchlorid. Mit der Methode der Suboccipitalinjektion (S.o.I.) lassen sich zunächst die in langdauernder NH_4Cl-Acidose von uns beobachteten Erscheinungen im akuten Versuch demonstrieren: Langsame intravenöse (i.v.) Infusion kleiner Dosen von Salmiak bei Hunden, deren Sinus carotici denerviert oder beseitigt sind, bleibt je nach der Größe der Dosis und der Geschwindigkeit der Injektion entweder so gut wie wirkungslos oder erzeugt sogar eine Abschwächung der Atmung, während S.o.I. schon einer viel kleineren Dosis vorübergehend eine

* OTTO LOEWI zum 80. Geburtstage zugeeignet.

starke Steigerung des Minuten-Atmungs-Volumens (M.A.V.) herbeiführt. Die Wasserstoff-Ionen, die, wie früher gezeigt, die Blut/Liquor-Schranke bei weitem nicht so rasch passieren können wie das alkalisierend und atmungsabschwächend wirkende Ammoniak, werden sogleich wirksam, wenn sie unter Umgehung der Barriere direkt auf das Hirn wirken können.

Für dieses in 3 Versuchen festgestellte Verhalten geben wir das folgende Beispiel:

Hund, 17,2 kg, Nembutalnarkose. Beide Sinus car. exstirpiert, beide Vagi durchschnitten. Innerhalb 4 min langsame i.v. Injektion von 10 cm³ einer 0,1% NH_4Cl-Lösung = 10 mg. Das M.A.V. beträgt während dieser Zeit zwischen 5150 und 5950, im Mittel 5610 cm³. M.A.V. in den darauffolgenden 8 min zwischen 4920 und 6080, im Mittel 5760 cm³. Hierauf nochmalige i.v. Injektion von 10 cm³ einer 0,2% NH_4Cl-Lösung = 20 mg innerhalb 13 min. Allmählich leichtes Absinken der Atmung, deren M.V. in den darauffolgenden 11 min zwischen 3770 und 5010 liegt, im Mittel 4050 cm³, das ist eine Abnahme um 33%. Nunmehr werden 5 mg innerhalb 6 min suboccipital injiziert. Das M.A.V. steigt während dieser Zeit von 3600 bis auf 7100 und beträgt in den darauffolgenden 6 min zwischen 6630 und 7650, im Mittel 7280 cm³, das ist eine Steigerung um 80%.

2. Lobelin. Ein analoges Verhalten zeigt das gebräuchlichste Atmungsanregungsmittel, das Lobelin. Nach Ausschaltung der Chemoreceptoren erzeugt i. v. Injektion entweder gar keine oder nur eine sehr geringfügige und rasch vorübergehende Wirkung, während S.o.I. eine gewaltige Steigerung des M.A.V. hervorrufen kann. Dieses Verhalten wurde in 5 von 6 Versuchen festgestellt, in einem Falle war keine deutliche Wirkung zu beobachten.

Als Beispiel sei ein an dem gleichen Hunde wie oben angestellter Versuch wiedergegeben:

Das einige Zeit nach Ausführung des NH_4Cl-Versuches wieder abgesunkene M.A.V. betrug während 6 min zwischen 3100 und 3650, im Mittel 3450 cm³. Nach einer einmaligen, durch die Manipulation bedingten Steigerung auf 4450 cm³ wurden 1,5 mg Lobelin i.v. injiziert. In den darauffolgenden 6 min betrug das M.A.V. zwischen 2500 und 3800, im Mittel 3320; hierauf erneut i.v. Injektion von 1 mg Lobelin. M.A.V. in den nächsten 5 min zwischen 3200 und 3870, im Mittel 3520. Nunmehr S.o.I. von 1 mg Lobelin. Das M.A.V. in den darauffolgenden Minuten zeigt die Werte 2600, 3860, 5700, 6100, 6500, 7450 cm³, also gegenüber dem vorhergehenden Mittelwerte eine maximale Steigerung um 112%. Innerhalb der nächsten 3 min Abfall auf 6300. Das M.A.V. bleibt dann erhöht zwischen 5000 und 6000.

3. Natriumcyanid. Die dritte, vom theoretischen Standpunkte aus vielleicht interessanteste Substanz, die wir untersucht haben, ist das NaCN. Die Chemoreceptoren sind diesem Stoffe gegenüber außerordentlich empfindlich. Nach Gesell u. Mitarb.[4], die seine Wirkung genau untersucht haben, würden beim Hunde unter Umständen 0,3 μg pro kg bei Injektion in die Carotis communis eine Atmungsverstärkung herbeiführen. Nach Ausschaltung der Sinus-Chemoreceptoren zeigten Dosen

bis zum 75fachen der vorher wirksamen Minimaldosen nur gelegentlich einen Erfolg. Auch bei direkter Injektion in die mit der Med. obl. in engerer Verbindung stehende Arteria vertebralis waren nach Denervierung der Sinus derartig hohe Dosen zur Erzielung eines Effektes erforderlich. Die Autoren haben auch bereits festgestellt, daß bei Injektion in den vierten Ventrikel chemoreceptorenloser Hunde eine Wirkung auftritt, zu deren Erzielung mitunter die von der Carotis aus reflektorisch wirksamen Dosen ausreichten. Die Autoren lassen es dahingestellt, ob diese dem Augenschein nach zentrale Wirkung auf die Atemzentren nicht vielleicht durch afferente Impulse von anderer Seite bedingt sein könnten. Die einfache Erklärung dieser zentralen Wirksamkeit nach Ausschaltung der peripheren Reizorte, nämlich die Umgehung der Blut/Hirn-Schranke, konnte erst nach Aufklärung des Verhaltens in der NH_4Cl-Acidose gefunden werden.

Beispiel: Hund, 18,6 kg. Nembutalnarkose. Beide Carotissinus exstirpiert. Intravenöse Injektion von 100 μg p. kg bleibt unwirksam. M.A.V. während 7 min vor der Injektion 7400—8270, im Mittel 7900 cm³, in der Minute der Injektion 8350, in den darauffolgenden 8 min zwischen 6900 und 8200, im Mittel 7540 cm³. Hierauf erfolgt S.o.I. von 21 μg p. kg. Das M.A.V., unmittelbar vorher 7950, 6650, 7250, im Mittel 7280 cm³, steigt sofort bis auf 9600 (+ 32%), mit raschem Abfall bis unter die Norm, auf 5930 cm³. Eine zweite i.v. Injektion einer noch höheren Dose als das erstemal, nämlich 200 μg p. kg, ergibt während der 3 min dauernden Injektion eine leichte Steigerung von unmittelbar vorher 6120 und 6200 auf maximal 6750, also weniger als 1%, und darauffolgendem Wiederabfall zur Norm. — Etwa 2 Std später wird, nachdem beide Vagi durchschnitten sind, noch einmal eine S.o.I. von 21 μg p. kg vorgenommen. M.A.V. vor der Injektion 6380, 6370, 6500, im Mittel 6420 cm³. Während der 2 min dauernden Injektion 6400 und 6750; nach der Injektion tritt zunächst eine gewaltige Zunahme der Amplitude mit starker Frequenzverminderung auf, so daß das M.A.V. sich zunächst nur wenig verändert, dann steigt es mit Rückkehr zur normalen Frequenz nach 3 min bis auf maximal 9300 cm³ (+ 45%) und sinkt hierauf wieder ab.

Schließlich sei noch kurz ein Versuch wiedergegeben, bei welchem die Wirkungen aller 3 Chemoreceptoren-Reizstoffe und außerdem noch die des O_2-Mangels nacheinander an ein und demselben Tier untersucht wurden.

Hund, 25 kg. Nembutalnarkose. Beide Carotissinus exstirpiert. Langsame i.v. Injektion von 400 mg NH_4Cl innerhalb 29 min führt zu einer geringfügigen Senkung des M.A.V. von im Mittel 7650 vorher auf 7200 cm³ nachher. 2mal nacheinander in einem Intervall von 10 min vorgenommene S.o.I. von je 10 mg NH_4Cl bewirkt unter starker Vertiefung und anfänglicher Verlangsamung der Atmung, im Verlaufe der darauffolgenden 18 min ein Ansteigen des M.A.V. bis auf fast 14000 cm³, worauf ein langsamer Abfall eintritt. Etwa ½ Std später werden beide Vagi durchschnitten. Das M.A.V. sinkt nach kurzer Steigerung auf 7—8000 cm³. Einatmung von 9% O_2 enthaltendem Stickstoff bewirkt keine Atmungsverstärkung. Trotz dieser Unwirksamkeit des O_2-Mangels erweist sich NaCN bei S.o.I voll wirksam. 8 μg p. kg erzeugt sogleich eine starke Vertiefung der Atmung, die trotz der damit verbundenen Frequenzverminderung das M.A.V. nach wenigen Minuten

von 7100 auf 10180 cm^3 hinauftreibt, um dann wieder zur Norm zurückzukehren. Als letztes wurde die Wirkung von *Lobelin* untersucht. 1 mg i.v. injiziert hatte keine deutliche Wirkung, S.o.I. von 0,1 mg und 10 min später 0,2 mg ließ das vorher zwischen 7500 und 8770 liegende M.A.V. bis zu 9500 cm^3 ansteigen. Ein zweiter O_2-Mangelversuch wie oben bewirkte wiederum kein Ansteigen des M.A.V., ebensowenig wie i.v. Injektion von 200 μg NaCN p. kg.

Was bei der Cyanid-Wirkung besonders bemerkenswert erscheint, ist das Folgende: Es wird allgemein angenommen, daß Sauerstoffmangel die Zentren nur auf dem Wege der Chemoreceptoren zu erregen vermag und direkt nur eine deprimierende Wirkung auslöst. Andererseits beruht allgemeiner Annahme zufolge die Cyanwirkung im wesentlichen auf Hemmung der Oxydationsvorgänge, also ebenfalls durch Erzielung von O_2-Mangel. Unter diesen Voraussetzungen erscheint es schwer verständlich, wieso die Oxydationshemmung durch Cyanid ihre erregende Wirkung beibehält, wenn die Herabsetzung des O_2-Druckes die entgegengesetzte Wirkung ausübt, oder zum mindest, wie auch der zuletzt angeführte Versuch zeigt, nicht atmungsverstärkend wirkt. Nun sind allerdings v. Euler u. Liljestrand[1] bei ihren Untersuchungen zu dem Schlusse gelangt, daß bei der Wirkung der Cyanide noch ein anderer Faktor eine Rolle spielen muß, der nach ihnen in dem Einfluß einer indirekt durch die Oxydationshemmung in den Geweben erzeugten Säurebildung bestehen würde. Der nach Denervierung der Sinus zurückbleibende Atmungseffekt würde auf dieser cH-Steigerung beruhen. Es bleibt hierbei allerdings ungeklärt, warum einfacher O_2-Mangel nicht ebenfalls zu einer erregenden Säurebildung führt. Die Wirkungsmechanismen müssen doch wohl in beiden Fällen voneinander verschieden sein.

Vor kurzem haben v. Euler u. Söderberg[2] gezeigt, daß man durch Chloralose die zentrale Wirkung von Kohlensäure auf die Atemzentren ausschalten kann, während die durch Reizung peripherer Nerven oder durch das auf dem Wege der Chemoreceptoren wirkende Lobelin erzeugten Veränderungen der Aktionsströme und Potentiale der Atemzentren erhalten bleiben können. Sie schließen daraus, daß der Angriffspunkt chemischer Reizwirkungen auf die Synapsen der die Atmungsimpulse entsendenden Zellen verschieden sein müsse von den durch periphere Reizung bedingten, daß es also besondere *intrazentrale Chemoreceptoren* gäbe, die auf chemischem Wege gesondert ausgeschaltet werden können. Unsere Beobachtung, daß Reizstoffe der peripheren Chemoreceptoren, die nach Ausschaltung der letzteren unwirksam geworden sind, weil sie die Blut/Liquor/Hirn-Schranke nicht passieren können, bei direkter Einwirkung auf die Zentren ihre Wirksamkeit wiedergewinnen, sind bis zu einem gewissen Grade ein Gegenstück zu den obigen Versuchen, und scheinen uns zugunsten der Eulerschen Auffassung zu sprechen.

Zusammenfassung.

Reizstoffe der Chemoreceptoren wie Ammoniumchlorid (Wasserstoff-Ionen), Lobelin, Natriumcyanid verlieren nach Ausschaltung der Chemoreceptoren ihre atmungsverstärkende Wirkung, weil sie die Blut/Liquor/Hirn-Schranke nicht passieren können. Bei direkter Einführung in den vierten Ventrikel gewinnen sie ihre Wirksamkeit zurück (vielleicht durch Erregung intrazentraler Chemoreceptoren).

Literatur.

[1] v. Euler, U. S., u. G. Liljestrand: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **76**, 27 (1937). — [2] v. Euler, C., and U. Söderberg: J. of Physiol. **118**, 545, 555 (1952). — [3] Heymans, C., J. J. Bouckaert et L. Dautreband: Arch. internat. Pharmacodynamie **40**, 54 (1931). — Literaturzusammenstellung in: Cord'er, D., et C. Heymans: Le centre respiratoire, 180ff. Paris 1935. — Heymans, C., u. J. J. Bouckaert: Erg. Physiol. **41**, 28 (1939). — [4] Winder, Cl. V., H. O. Winder and R. Gesell: Amer. J. Physiol. **105**, 311 (1933). — [5] Winterstein, H., u. N. Gökhan: Pflügers Arch. **256**, 85 (1952). — [6] Winterstein, H., et N. Gökhan: Arch. internat. Pharmacodynamie **93**, 212 (1953).

Prof. Dr. Hans Winterstein, Physiologisches Institut der Universität Istanbul.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 197—213 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. Häusler).

Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse.

III. Mitteilung.

Das Vorkommen und die Bedeutung der Substanz P in den dorsalen Wurzeln des Rückenmarks*.

Von
F. Lembeck.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. März 1953.)

In Anlehnung an einen bereits 1935 von Dale[4] gegebenen Hinweis hatten Hellauer u. Umrath[23, 24, 38, 39] versucht, den Axonreflex zum Nachweis einer „Erregungssubstanz sensibler Nerven" zu verwenden.

Ausgehend von der Annahme, daß der hypothetische Überträgerstoff der zentralen Synapse des peripheren sensiblen Neurons sowohl im Verlauf des ganzen Nerven vorhanden ist als auch die den Axonreflex charakterisierende Gefäßerweiterung hervorruft, unternahmen die genannten Autoren Versuche, um diesen Stoff aus dorsalen Wurzeln des Rückenmarks zu extrahieren und an einem Axonreflex zu testen. Sie fanden tatsächlich, daß Hinterwurzelextrakte bei intracutaner Injektion in ein denerviertes Kaninchenohr eine deutliche Rötung erzeugten, die nach etwa 10 min auftritt und 15 bis 30 min anhält. Die Wirkung ließ sich sicher von Acetylcholin und Histamin differenzieren.

Ferner konnten sie zeigen, daß diese Erregungssubstanz sensibler Nerven durch ein hauptsächlich in Hinterwurzeln vorkommendes Enzym abgebaut wird. Dieser Abbau kann durch Strychnin und einige andere Krampfgifte gehemmt werden. Holton u. Perry[27] untersuchten die antidrome Gefäßerweiterung des Kaninchenohres mit ihrer sehr empfindlichen Methode und fanden nach Reizung des peripheren Endes des durchschnittenen N. auricularis magnus mit einem Einzelimpuls eine nach 10 sec beginnende und 3—4 min anhaltende Gefäßerweiterung. Die Wirkung war durch Strychnin nicht verstärkbar, Histamin und Acetylcholin konnten als Überträgerstoffe dieser Gefäßerweiterung ausgeschlossen werden. In weiteren Untersuchungen fanden Holton u. Holton[26], daß bei der antidromen Reizung im Perfundat des Kaninchenohres Adenosintriphosphorsäure (ATP) oder eine Substanz mit einem sehr ähnlichen UV-Absorptionsspektrum abgegeben wird: Sowohl ATP als auch Extrakte aus Vorder- *und* Hinterwurzeln zeigen am Kaninchenohr eine langanhaltende Gefäßerweiterung, wobei diese Wirkung durch Hemmstoffe der Cholinesterase gehemmt wird. Über eine unterschiedliche Wirksamkeit von Vorder- und Hinterwurzelextrakten berichteten Holton u. Holton[25] nur im Zusammenhang mit der blutsenkenden Wirkung dieser Extrakte; diese gegen Acetylcholin, Histamin, Adenosinverbindungen und Substanz P abgegrenzte

* Herrn Prof. Dr. Otto Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

Wirkung verschwindet bei Inkubation frischer Wurzelextrakte in den Vorderwurzel- wesentlich rascher als in den Hinterwurzelextrakten. Diese Enzymwirksamkeit bestätigen in gewisser Hinsicht die Befunde von Hellauer u. Umrath[23, 24, 38, 39]. Hinsichtlich der Spezifität der ATP als „sensory transmitter" sei jedoch daran erinnert, daß auch Acetylcholin und Histamin bei antidromen Reizungen gefunden wurde, was aber, wie Gaddum[16] vor kurzem deutlich unterstrich, noch keineswegs als Beweis für ihre Rolle als Überträgerstoff aufgefaßt werden darf.

Zur besseren, nämlich auch quantitativen Erfaßbarkeit von Extrakten aus Rückenmarkswurzeln nach der Methode von Hellauer u. Umrath[23] am Kaninchenohr war schon 1950 von Häusler u. Hellauer[21] eine photoelektrische Methode angegeben worden. Später hat Florey[14] eine Auswertung der Extrakte an sogenannten Manegebewegungen von Bienen versucht, wobei die Abweichbewegung der Biene nach Einbringen in ein Auge beobachtet wurde: Acetylcholin, Eserin und Vorderwurzelextrakt bedingten eine kontralaterale Abweichung, während Strychnin, Pikrotoxin und Hinterwurzelextrakt eine ipsilaterale Abweichung zur Folge hatten. Der genannte Autor hat überdies zahlreiche Arten des Tierreiches auf ihre relative Strychnin- und Pikrotoxinempfindlichkeit untersucht und daraus auf die Bedeutung der Erregungssubstanz sensibler Nerven bei den einzelnen Tiergruppen geschlossen.

Da die zuerst von Euler u. Gaddum[9] beschriebene, vermutlich peptidartig strukturierte Substanz P im Darm und im Gehirn vorkommt und an charakteristischen pharmakologischen Eigenschaften vor allem eine atropinresistente Blutdrucksenkung und eine ebenfalls atropinresistente Darmkontraktion zeigt[17, 7, 8], schien es interessant und wichtig, sie mit der von Hellauer u. Umrath[22, 23, 24, 38, 39] beschriebenen, aber noch nicht identifizierten Überträgersubstanz dahingehend auszuwerten, ob sie ihr gleichen oder zumindest ähnlich sein könnte.

Freilich hatten Vogt u. Mitarb.[29, 40, 13] auf Grund ihrer Untersuchungen über die physiologische Bedeutung dieser wahrscheinlich mit dem Vogtschen „Darmstoff" identischen Substanz P im Gegensatz zu v. Euler u. Gaddum[9] sowie v. Euler[7] die Ansicht vertreten, daß es sich nicht um einen einheitlichen Stoff handle, sondern die Darm- und Blutdruckwirksamkeit auf verschiedene Substanzen zurückgeführt werden könne. Fischer u. Vogt[13] fanden, daß nach Einwirken von Trypsin hauptsächlich die Blutdruckwirkung verschwindet und daß im Papierchromatogramm die Blutdruckwirksamkeit zwischen Rf 0—0,3 gelegen ist, während die Darmwirksamkeit nicht nur in diesen Fraktionen, sondern vor allem in Fraktionen mit höherem Rf-Wert von 0,8—1,0 zu finden war. Gernandt[18] beobachtete eine Herabsetzung der Schwelle des Peristaltikreflexes durch Substanz P. Pernov[33] untersuchte die Verteilung der Substanz P im Verdauungstrakt und fand sie besonders reichlich in der Muscularis mucosae, hinsichtlich der einzelnen Abschnitte des Darmes hauptsächlich in den Abschnitten mit stärkerer Motilität. Ähnliche Untersuchungen unternahmen Feldberg u. Mitarb.[5], die gleichzeitig mit dem Vorkommen von Histamin in den verschiedenen Teilen des Verdauungstraktes auch den Gehalt an Substanz P bestimmten: Bei Prüfung von Extrakten aus dem Verdauungskanal am isolierten Meerschweinchenileum fanden sie eine trotz Atropin und Antihistamin auslösbare Kontraktion, die in einem ziemlich konstanten Verhältnis zum Histamingehalt dieser Extrakte stand und etwa $^1/_5$ der Histaminwirkung ausmachte; diese Wirksamkeit wurde der Substanz P zugeschrieben, da von anderen Substanzen mit ähnlichen Eigenschaften nur Serotonin (Enteramin, Oxytryptamin — als Kreatininsulfat)[6, 15] in Erwägung

zu ziehen war, während über die Ähnlichkeit des Bradykinin[34, 35, 41, 42] mit Substanz P noch nicht genug ausgesagt werden kann. Neben der ziemlich ausführlichen Untersuchung über das Vorkommen der Substanz P im Verdauungstrakt und der von allen Untersuchern vertretenen Ansicht einer Bedeutung der Substanz P für die Darmmotilität findet sich nur bei GULLBRING[20] ein Hinweis darauf, daß die Substanz P des Zentralnervensystems vor allem in den Stammganglien zu finden ist, während eine detaillierte Untersuchung in verschiedenen Abschnitten des Zentralnervensystems oder in peripheren Nerven bisher nicht erfolgte. Eine enzymatische Zerstörung der Substanz P erreichte GULLBRING[20] mittels acetongetrockneten Pulvers aus Basalganglien oder aus Darm, hingegen kaum mit gleichen Extrakten aus quergestreifter Muskulatur und gar nicht mit Extrakten aus Blut oder Rückenmark.

Wenngleich auch nach den bisherigen Befunden kein Hinweis für die Wirksamkeit der Substanz P als einer Erregungssubstanz irgendwelcher Nerven vorlag, so erschien doch zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen die Substanz P als die einzige der bisher beschriebenen und genauer untersuchten Substanzen dafür in Frage zu kommen. Aus diesem Grunde wurde neben einer Reihe anderer biologischer Testobjekte (Rattenuterus, Rattencolon, Froschrectum u. a.) bald nur das mehr isolierte Meerschweinchenileum unter Atropin und Antihistamin verwendet, an welchem sich schon mit Rohextrakten ein deutlicher Unterschied zwischen Vorder- und Hinterwurzeln ergab.

Methodik.

Untersuchungsmaterial.

Die Rückenmarkswurzeln wurden im Schlachthof sofort nach der Spaltung der Wirbelsäule entnommen. Genügende Mengen konnten hauptsächlich vom Abgang des Lumbalplexus gewonnen werden, wobei ausschließlich die intradural, also bei den dorsalen Wurzeln proximal vom Spinalganglion gelegenen Abschnitte der dorsalen und entsprechend lange Stücke der ventralen Wurzeln zur Verwendung kamen. Innerhalb weniger Minuten wurden die Wurzeln anfangs mit der 3fachen Menge n/10 H_2SO_4 aufgekocht, in späteren Versuchen mit destilliertem Wasser bei einem durch Zusatz von n/10 H_2SO_4 erzielten p_H 4—5. Erst nach einigen Stunden wurden die Wurzeln mit Seesand zerrieben, nochmals 5 min gekocht und dann filtriert. Die ziemlich klaren Filtrate wurden bei +2°C aufgehoben und kurz vor dem Austesten mit n/10 NaOH neutralisiert.

Rückenmark und Dünndarm von Rindern wurden nach Reinigen möglichst rasch nach der Entnahme zunächst ebenfalls mit der 3fachen Menge n/10 H_2SO_4 und später schwefelsauer bei p_H 4—5 aufgekocht, dann in einem Turmix zerkleinert, nochmals 5 min gekocht und anschließend filtriert. Beim Kochen mit n/10 H_2SO_4 gelierten die Darmextrakte nach Erkalten, während die Rückenmarksextrakte etwas opake Filtrate bildeten, die erst durch Zusatz von n/10 NaOH bis p_H 6 und nochmaliges Erhitzen und Filtrieren geklärt werden konnten. In den späteren Versuchen mit Aufkochen bei p_H 4—5 blieb schon das erste Filtrat völlig klar. Selbst bei wochenlangem Aufheben der sauren Extrakte bei +2° C konnte kein Verlust an Wirksamkeit festgestellt werden.

Zum methodischen Vergleich wurden auch Extrakte nach dem Vorgehen von HELLAUER u. UMRATH[23] bereitet, nämlich durch sofortiges Aufkochen mit 0,6%iger NaCl-Lösung bei nur grober Zerkleinerung ohne Zerreiben. Es konnte kein Wirkungsunterschied gegenüber unseren Extrakten festgestellt werden, welche jedoch

den Vorteil hatten, völlig klar zu sein. Außerdem war das neutrale Aufkochen in Hinblick auf die dabei erhalten bleibenden Adenosinverbindungen, welche das Ergebnis am Darm hätten beeinflussen können, weniger geeignet.

Die weitere Aufarbeitung der Rohextrakte wird im Rahmen der Ergebnisse besprochen.

Untersuchungsmethoden.

Die Untersuchung am Meerschweinchenileum wurde in der für die Austestung von Histamin üblichen Weise durchgeführt (Barsoum u. Gaddum[1]), doch wurde der Tyrodelösung nicht nur Atropin, sondern auch Neoantergan*, beides in der Konzentration von 1 μg/ml zugesetzt, nachdem Vorversuche ergeben hatten, daß bei einem Zusatz von 0,5 μg/ml Atropin noch 10 μg/ml Acetylcholin und bei einem Zusatz von 0,1 μg/ml Neoantergan noch 10 μg/ml Histamin fast unwirksam waren. Die auf diese Weise erhaltene Wirksamkeit von Extrakten wurde als vorhandene Menge an Substanz P gewertet, wie das schon Feldberg u. Mitarb.[5] angeben.

In einigen Versuchen wurde das von Kuck u. Vogt[29] verwendete Mäuseileum benützt, doch zeigte es sich sowohl hinsichtlich Empfindlichkeit, Regelmäßigkeit wie auch Dauer der Verwendbarkeit dem Meerschweinchenileum gegenüber unterlegen.

Blutdruckversuche wurden an Katzen in Chloralose-, an Kaninchen in Chloralose- oder Nembutalnarkose und an Ratten in Urethannarkose ausgeführt. Wie schon Bjurstedt, Euler u. Gernandt[2] feststellten, eigneten sich Chloralose-Kaninchen am besten. Ratten wurden hauptsächlich zur Auswertung der Fraktionen des Papierchromatogrammes verwendet.

Die papierchromatographischen Untersuchungen wurden mit Filterpapier Nr. 214 der Fa. Machery & Nagel ausgeführt. Als Lösungsmittelgemisch wurde Isopropanol: Eisessig: Wasser im Verhältnis 70:20:10 verwendet. Das Gemisch hat den Vorteil besonderer Flüchtigkeit, weshalb die Papiere ziemlich rasch und schonend getrocknet werden konnten und das Eluiren der restlichen Essigsäure mit Äther sich meistens erübrigte. Die Wanderungsgeschwindigkeit im absteigenden Chromatogramm betrug etwa 2 cm/Std. Die Extrakte aus Rückenmark, Darm und dorsalen Wurzeln wurden jeweils auf 5 cm breiten Streifen bis zum Rand hin aufgetragen. Dies erwies sich besonders bei den Rohextrakten als notwendig, da diese eine gewisse Verzögerung der Lösungsmittelfront am Auftragungsort bewirkten, wodurch die Lösungsmittelfront zuerst seitlich weiter vordrang und schließlich ein uneinheitliches Wanderungsbild entstand. Zur Anfärbung wurde für Histamin eine 1%ige Lösung von Ninhydrin in n-Butanol verwendet, für Serotonin entweder Ninhydrin oder, nach vorherigem Besprühen mit 5%iger Natriumbicarbonatlösung, Diazo I und Diazo II. Neben diesen nur ergänzenden Untersuchungen über die Anfärbbarkeit wurden die Papierchromatogramme mit Substanz P und den verschiedenen anderen eluierten Extrakten am Meerschweinchenileum und Rattenblutdruck untersucht. Zur Elution, welche in ähnlicher Weise wie von Crawford u. Outschoorn[3] geschah, wurden Streifen gleicher Breite aus dem getrockneten Chromatogramm ausgeschnitten und mit dem einen Ende etwa 1 cm breit zwischen 2 schräg gestellte Glasplatten eingeklemmt. Diese Glasplatten wurden mit der anderen Seite in destilliertes Wasser eingetaucht, so daß Wasser im capillaren Spalt zwischen den beiden Platten emporsteigen und in das Filterpapier vordringen konnte. Gleichzeitig wurde ein elektrischer Heizkörper etwa 60 cm unterhalb aufgestellt, so daß das Wasser im mäßig warmem Luftstrom langsam verdunsten und dadurch neues in die Streifen nachströmen konnte. Kontrollversuche ergaben in etwa 30 min eine quantitative Anreicherung im äußersten

* N-α-Pyridyl-p-Methoxybenzyl-N'-Dimethyl-Äthylendiamin.

etwa 1 cm breiten Abschnitt dieser Streifen. Diese 1 cm breiten Enden wurden daraufhin abgeschnitten und 1 Std lang in einer Eprouvette in 1,0 ml Tyrodelösung eluiert, mit n/10 NaOH neutralisiert und dann zum Austesten verwendet.

Substanz P (ein Präparat mit 4 Einheiten pro mg von Herrn Prof. U. S. v. Euler-Stockholm) überließ uns in freundlicher Weise Herr Doz. Dr. H. F. Hellauer. d- und l-Polamidon verdanken wir Herrn Prof. O. Schaumann-Innsbruck. Neoantergan wurde von der Fa. La Specia-Paris, Serotonin (Oxytryptaminkreatininsulfat) von der Upjohn Comp.-Kalamazoo zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse.

Prüfung am Meerschweinchenileum. Die ersten Untersuchungen mit Rohextrakten aus ventralen und dorsalen Wurzeln des Rückenmarks am isolierten Meerschweinchendarm ohne Atropin und Antihistamin ergaben zunächst eine etwa doppelt so starke Wirksamkeit der Vorderwurzelextrakte (Abb. 1). Nach Zugabe von Atropin verschwand die Wirksamkeit des Vorderwurzelextraktes, während die des Hinterwurzelextraktes unverändert erhalten blieb und auch nach weiterer Zugabe von Neoantergan keine Änderung erfuhr. Hingegen zeigten die Extrakte aus Dünndarm, welche größere Mengen an Histamin (50 bis 150 μg/g) enthalten, auf Zugabe von Neoantergan eine starke Abnahme

Abb. 1. Meerschweinchenileum. Rohextrakte aus ventralen (*V*) und dorsalen (*D*) Wurzeln vor und nach 1 μg/ml Atr(opin) und 1 μg/ml N(eo-)Ant(ergan). Die Zahlen für *V* und *D* bedeuten Milligramm Frischgewebe, aus dem der zugesetzte Extrakt bereitet wurde. Einwirkungsdauer jeweils 30 sec, Pause jeweils 1 min.

der Wirksamkeit, wobei aber bei einer größeren Menge Darmextrakt wiederum eine Kontraktion auslösbar war, die sich als atropin- und antihistaminresistent erwies (Abb. 2).

Man sieht, daß durch Zugabe von Neoantergan sowohl die Wirksamkeit von 0,5 μg Histamin wie auch die eines wirkungsgleichen Darmextraktes (entsprechend 4 mg Darm) verhindert werden konnte; nach Zugabe der zehnfachen Menge Histamin bzw. Darmextrakt (5 μg Histamin bzw. Extrakt entsprechend 40 mg Darm) kam es hingegen nur zu einer Hemmung der Histaminkontraktionen durch Neoantergan, während der Darmextrakt in dieser Menge stark wirksam war. Dies stimmt mit

ähnlichen Beobachtungen von FELDBERG u. Mitarb.[5] überein. Die zugesetzte Atropin- bzw. Neoantergan̈menge war in jedem Falle ausreichend, um die im Darm und in den Rückenmarkswurzeln gefundenen Histaminmengen ($< 0{,}1$ μg/g[30] bzw. 2,2 μg/g[43, 44]) sowie auch das vor allem in den Vorderwurzeln enthaltene Acetylcholin (10—20 μg/g[31, 32, 10]) ausschalten zu können.

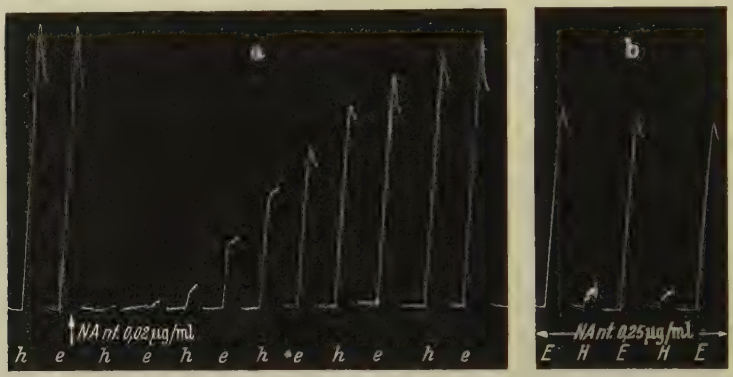


Abb. 2. Meerschweinchenileum unter 1 μg/ml Atropin. (Einwirkungsdauer 30 sec, Pause jeweils 1 min) a) Vergleich eines Darmextraktes *e* (entsprechend 4 mg Darm) mit Histamin *h* (= 0,5 μg Histamin): Auf einmalige Zugabe von 0,02 μg/ml Neoantergan (NAnt.) erfolgt gleich starke Hemmung von *e* und *h*. b) Unter dauerndem Zusatz von 0,25 μg/ml Neoantergan: Zehnfache Menge Darmextrakt bzw. Histamin (*E* entsprechend 40 mg Darm, *H* = 5 μg Histamin): nur der Darmextrakt bleibt wirksam.

Nur in wenigen Fällen war die Wirksamkeit der Vorderwurzeln an außergewöhnlich empfindlichen Darmstücken noch erfaßbar und betrug dann etwa ein Zehntel der Wirksamkeit der Hinterwurzelextrakte (Abb. 3). Meist konnte aber ein solcher Vergleich nicht durchgeführt werden, da die Vorderwurzelextrakte entweder eine kaum feststellbare oder gar keine Wirksamkeit zeigten. Die Austestung am isolierten Meerschweinchendarm gegen Substanz P ergab unter den angegebenen Bedingungen im Rückenmark 6 Einheiten, in den dorsalen Wurzeln 4,4 Einheiten und in den Vorderwurzeln $< 0{,}37$ Einheiten der Substanz P pro Gramm feuchten Gewebes.

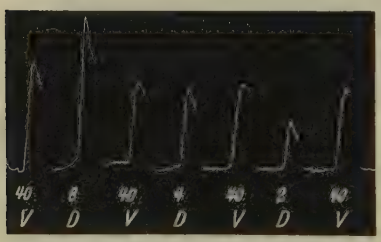


Abb. 3. Vergleich von ventralen (*V*) und dorsalen (*D*) Wurzeln an einem sehr empfindlichen Meerschweinchenileum (Atropin und Neoantergan je 1 μg/ml, Einwirkungsdauer jeweils 30 sec, Pause jeweils 1 min): Die Wirksamkeit von 40 mg ventralen Wurzeln entspricht 4 mg dorsalen Wurzeln.

Eigenschaften. Es war nun notwendig, weitere Vergleichsmöglichkeiten mit Substanz P zu gewinnen, auf Grund welcher erst eine sichere Schlußfolgerung gerechtfertigt sein konnte.

Hierzu schienen, wie noch später erwähnt wird, Untersuchungen mit wenig gereinigten Extrakten für eine qualitative pharmakologische Prüfung durch

Vergleich an verschiedenen Testpräparaten von vorneherein wenig aussichtsvoll, da schon die nicht auf Substanz P zurückzuführende, blutdrucksenkende Wirkung von Vorder- und Hinterwurzeln etwa Blutdruckversuche mit Rohextrakten unmöglich machte, wie Abb. 4 zeigt. Die zur Abtrennung des wirksamen Prinzips unternommenen Versuche wurden in den meisten Fällen gleichzeitig auch mit Darm- und Rückenmarksextrakten durchgeführt, da bei der schweren Gewinnung von Rückenmarkswurzeln zumindest Voruntersuchungen mit anderen Extrakten vertreten werden konnten.

Rohextrakte aus Darm, Rückenmark und dorsalen Wurzeln wurden nach Zusatz von HCl bzw. NaOH bis zum Erreichen des gewünschten p_H 30 min ins kochende Wasserbad gestellt, anschließend abgekühlt,

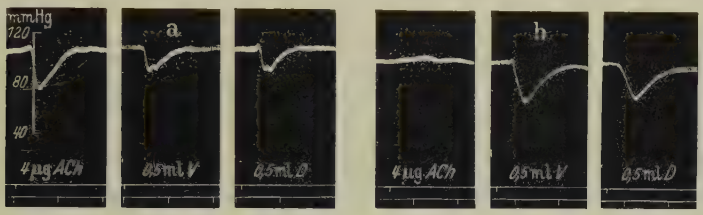


Abb. 4. Kaninchenblutdruck. Nembutalnarkose. Acetylcholin (*Ach*), Rohextrakte aus ventralen (*V*) und dorsalen (*D*) Wurzeln; a) vor, b) nach 10 mg/kg Atropin. Zeit in min.

auf p_H 4—5 gebracht und erst kurz vor dem Austesten neutralisiert. Zwischen p_H 3 und 9 zeigten die Extrakte eine weitgehende Beständigkeit, bei höheren und niedrigeren p_H-Werten nahm die Wirksamkeit rasch ab und bei p_H 1 bzw. 10—11 war nach 30 min nahezu keine Darmwirksamkeit mehr vorhanden. Die Darmextrakte waren im Alkalischen etwas widerstandsfähiger als die Rückenmarks- und Hinterwurzelextrakte. Auch in Versuchen, in denen Rückenmarks- und Darmextrakte bei p_H 10 und 11 eine Stunde lang im kochenden Wasserbad gelassen und alle 5 min Kontrollproben entnommen wurden, zeigte sich im Vergleich zu den Darmextrakten eine raschere Abnahme der Wirksamkeit der Rückenmarksextrakte. Bei p_H 4—6 hatte selbst stundenlanges Erhitzen auf 100° C keinen nennenswerten Einfluß auf die Wirksamkeit. Vergleichsproben von Hinterwurzelextrakten wurden intracutan ins Kaninchenohr injiziert und die Rötung beobachtet: Bei Verschwinden der Darmwirksamkeit durch Erhitzen im Alkalischen bzw. stark Sauren konnte nur mehr eine wesentlich geringere Rötung beobachtet werden.

Aus dem Gewebe wie auch aus Rohextrakten, welche in dünner Schichte auf einem Uhrglas eingedampft worden waren, konnte die darmwirksame Substanz mit 90%igem Äthanol, Methanol und Eisessig extrahiert werden, hingegen nicht mit Aceton, Petroläther, Äther und absolutem Alkohol.

Dialyseversuche ergaben, daß bei 24stündiger Dialyse durch Cellophan gegen das gleiche Volumen Wasser entweder die gleiche Wirksamkeit

auf beiden Seiten der Membran zu finden oder das Dialysat nur um weniges schwächer war.

Fällungen. Zur Klärung der Frage, ob die darmkontrahierende Substanz der Hinterwurzeln in ähnlicher Weise wie die Substanz P gefällt und angereichert werden kann, wurde ein der Eulerschen[8] Extraktionsmethode ähnlicher Weg beschritten. Der Vollständigkeit halber wurden die Untersuchungen gleichzeitig mit Rückenmarks- und Darmextrakten ausgeführt.

Die Rohextrakte wurden zunächst am kochenden Wasserbad bis auf 1 g Gewebe pro ml eingeengt, dann mit der 2,5fachen Menge 90%igem Äthanol versetzt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Die entstehende Fällung wurde abzentrifugiert, im halben ursprünglichen Volumen Wasser gelöst und nochmals mit der 2,5fachen Menge Äthanol gefällt. Die Fällung wurde verworfen, die klaren überstehenden Lösungen wurden vereinigt und auf 2 g Gewebe pro ml eingeengt. Kontrolluntersuchungen ergaben bei diesen Arbeitsgängen keinen Verlust an Wirksamkeit. Nach $^7/_{10}$ Sättigung mit Ammonsulfat, welche beim Darmextrakt nach 24stündigem Stehen im Kühlschrank eine große, bei den Rückenmarks- und Wurzelextrakten eine bedeutend geringere Menge niederschlug, wurde die Fällung in 0,5 ml Eisessig pro Gramm Ausgangsmaterial suspendiert, zentrifugiert und der Bodensatz nochmals in der halben Menge Eisessig aufgeschwemmt und abzentrifugiert. Die Eisessigextrakte wurden vereinigt und mit der 3fachem Menge Äther versetzt, die nach 24stündigem Stehen im Kühlschrank entstandene Fällung mehrmals mit Äther gewaschen und getrocknet. Bezogen auf 1 g feuchtes Gewebe wurden aus Darm 0,9, aus Rückenmark 0,3 und aus den Vorder- bzw. Hinterwurzeln 0,4 mg trockene Fällung gewonnen; die eisessigunlöslichen Rückstände betrugen in analoger Weise 2—3 mg.

Beim Vergleich mit Substanz P zeigten die Eisessig-Äther-Fällungen eine Wirksamkeit von 6,4 Einheiten pro mg beim Darmextrakt, 3,2 Einh./mg bei Rückenmarksextrakt und 0,4 Einh./mg beim Hinterwurzelextrakt; eine Wirksamkeit des Vorderwurzelextraktes konnte nicht nachgewiesen werden, er ergab vielmehr eine angedeutete Hemmung der Spontanrhythmik des Darmes. Die Ausbeute war bei den dorsalen Wurzeln — mit zwangsläufig kleinerem Ansatz (20 g Wurzeln) — schlechter. Im eisessigunlöslichen Rückstand blieben 30—40% der Wirksamkeit. Die Gewichtsgleichheit der Eisessig-Äther-Fällungen von ventralen und dorsalen Wurzeln bei deutlichem Wirksamkeitsunterschied zeigt, daß die wirksame Substanz nur einen Bruchteil der letzten Fraktion ausmachen konnte. Auf der Basis von Eulers aus dem Darm gewonnenen Präparat (4 Einh./g) berechnet, konnten in der Eisessig-Äther-Fällung der dorsalen Wurzeln nur etwa 10% Substanz P sein, während die Fällung aus Rückenmark an die Reinheit seines Präparates herankommt und die Darmfällung dieses sogar noch etwas übertrifft. Wegen der geringen Mengen an Rückenmarkswurzeln, die zur Verfügung standen, wurden Versuche zu einer weiteren Anreicherung unterlassen.

Papierchromatographie. Zur weiteren Identifizierung wurde die Papierchromatographie herangezogen.

Das verwendete Lösungsmittelgemisch hatte, wie erwähnt, den Vorteil besonderer Flüchtigkeit, so daß die Trocknung im mäßig warmen Luftstrom bei einer Dauer von 30—40 min vollkommen ausreichte. Das schwach saure Eluat wurde mit n/10 NaOH neutralisiert. Die Rohextrakte erwiesen sich zur Papierchromatographie wenig geeignet, weshalb zu den meisten Versuchen Extrakte verwendet wurden, aus denen Ballaststoffe durch Äthanolfällung abgetrennt worden waren. Kontrollstreifen wurden mit Ninhydrin angefärbt und zeigten neben einer deutlichen blauvioletten Färbung an der Auftragungsstelle in verschiedenem Ausmaß eine langsam abblassende Färbung bis gegen Rf 0,7—0,8. Die Rf-Werte für Histamindichlorhydrat betrugen 0,4—0,5 und für Serotonin 0,48—0,67.

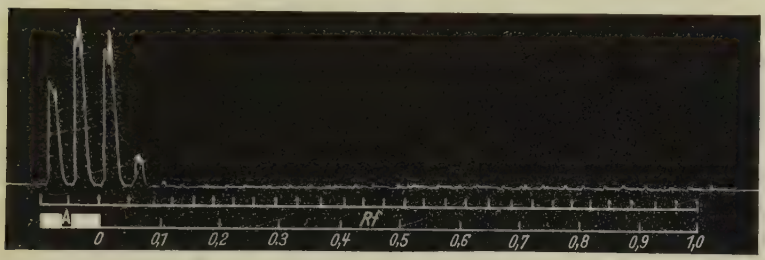


Abb. 5. Meerschweinchenileum (Atropin und Neoantergan je 1 μg/ml). Darmwirksamkeit der einzelnen Fraktionen eines Papierchromatogrammes mit Rückenmarksextrakt. Obere Linie: Markierung = Zusatz der Fraktionen. Untere Linie: Auftragungsort (A) und Rf-Werte.

Die nach Elution durch Austestung am Darm ermittelte Wirksamkeit für Substanz P lag zwischen Rf 0 und 0,1, also praktisch an der Auftragungsstelle. Auch die Wirksamkeit der Darm-, Rückenmarks- und Hinterwurzelextrakte wurde in den untersten Fraktionen bis höchstens Rf 0,2 angetroffen, was sowohl mit Rohextrakten als auch mit den Eisessig-Äther-Fällungen zu sehen war (Abb. 5). Wurden die Rohextrakte aus Darm oder Rückenmark in höherer Konzentration aufgetragen, so fand sich neben der ziemlich stationär bleibenden Wirkung entsprechend der Substanz P auch noch eine zweite Stelle mit einem Rf-Wert von etwa 0,6—0,7, also in Höhe des vorderen Randes der Ninhydrin-Anfärbbarkeit, aus der ein darmwirksamer Faktor eluiert werden konnte.

Bei einem Teil der papierchromatographischen Untersuchungen wurden die Eluate gleichzeitig auf ihre Blutdruckwirksamkeit untersucht; diese Untersuchungen wurden mit Rücksicht auf die geringen Mengen an Ratten in Urethannarkose ausgeführt. Chromatogramme, welche nur in den niedrigsten Fraktionen eine Darmwirksamkeit zeigten, ergaben auch nur bei diesen Rf-Werten eine Blutdrucksenkung, während andere Fraktionen unwirksam waren. Chromatogramme, welche um Rf 0,7 eine Darmwirksamkeit aufwiesen, ergaben ebenfalls nur in den niedrigsten Fraktionen eine deutliche Blutdrucksenkung, während um Rf 0,7 nur eine geringe Blutdrucksenkung resultierte, welcher manchmal eine ganz kurze geringe Blutdrucksteigerung vorausging. Diese Befunde sind ähnlich den Ergebnissen von Fischer u. Vogt[13], die zwar ein anderes Lösungsmittelgemisch verwendeten, aber bei Untersuchungen mit Substanz P und Darmextrakten eine blutdruckwirksame

Fraktion mit niedrigem Rf-Wert und eine darmwirksame Fraktion mit höheren Rf-Werten beschrieben, wobei letztere nicht ganz frei von Blutdruckwirksamkeit war. Der Rf-Wert um 0,7, die Darm- und Blutdruckwirksamkeit dieser zweiten Komponente der Extrakte lassen die Vermutung zu, daß es sich dabei um Serotonin handeln könnte, dessen Ursprung aber erst näher untersucht werden müßte, weil es schließlich auch aus dem bei der Aufarbeitung in den Geweben noch vorhandenen Blut stammen könnte. Bei der Chromatographie der Eisessig-Äther-Fällungen und der Substanz P konnte diese zweite wirksame Fraktion nicht gefunden werden. Die Ergebnisse von Fischer u. Vogt[13] scheinen demnach eher eine Beimengung als eine Uneinheitlichkeit der Substanz P zu zeigen.

Blutdruckversuche. Proben der verschiedenen o. e. Fällungen wurden außer am Meerschweinchenileum am Blutdruck (Kaninchen in Chloralosenarkose nach vorheriger Injektion von 10 mg Atropin und 5 mg Neoantergan pro Kilogramm) mit Substanz P verglichen. Während die Rohextrakte aus Rückenmark dem am Meerschweinchendarm gefundenen Vergleichswert von Substanz P entsprachen, verursachten Extrakte aus dorsalen *und* ventralen Wurzeln eine Blutdrucksenkung, welche bei beiden ungefähr gleich stark (Abb. 4), aber auch bei den Hinterwurzelextrakten etwas größer als das Substanz P-Äquivalent am Darm war.

Dies bestätigt die Befunde von Holton u. Holton[25], die ja selbst die von ihnen beschriebene blutdrucksenkende Wirkung von Rückenmarkswurzeln von Substanz P differenzieren. Hingegen ergaben die Blutdruckwerte der mit Eisessig-Äther gefällten Extrakte in bezug auf Substanz P eine Kongruenz mit der Darmwirksamkeit.

Kaninchenohr. Bei einem Vergleich der verschiedenen am Darm wirksamen Extrakte mit der Testmethode von Hellauer u. Umrath[23] mittels intracutaner Injektion in das denervierte Kaninchenohr zeigte sich, daß alle am Darm wirksamen Rohextrakte auch zu einer entsprechenden Rötung am Kaninchenohr führten. Da der Kaninchenohrtest, welcher wohl eine sichere qualitative, mit einer beschränkten Anzahl von Kaninchen aber noch keine genauere quantitative Untersuchung zuläßt, wurde nur immer vergleichsweise die Wirkung von je 2 Extrakten gegeneinander geprüft und die so erhaltene Reihung zum Vergleich herangezogen. Bei der Prüfung der Fraktionen der Papierchromatogramme aus Darm, Rückenmark und Hinterwurzeln zeigten auch diese eine Rötung in den darmwirksamen Fraktionen. Auch die durch Fällungen gereinigten Extrakte sowie Substanz P ergaben ebenfalls in den am Darm angewandten Verdünnungen eine Rötung des Kaninchenohres.

Enzymatischer Abbau. Da sich in diesem Zusammenhang besonders die Frage nach einer Identität oder Ähnlichkeit mit dem von Hellauer u. Umrath[23, 24, 38, 39] beschriebenen Faktor erhob, wurden enzymatische Abbauversuche, wie sie diese Autoren und schon früher Gullbring[20] mit Substanz P unternommen hatten, durchgeführt.

Als Substrat dienten Rohextrakte, als enzymhaltiger Extrakt eine Aufschwemmung von steril entnommenen dorsalen Wurzeln in Kochsalzlösung (1 g feuchtes Gewebe auf 20 ml). Der enzymhaltige Extrakt war besonders wirksam, wenn er etwa 15 Std bei 33° C aufbewahrt worden war, was vielleicht mit der in dieser Zeit eingetretenen Diffusion von Enzym in die Flüssigkeit erklärt werden könnte. Dieser Extrakt wurde den auf p_H 7 gebrachten Rohextrakten bzw. einer Lösung von Substanz P (1 Einh./ml) in einer Menge zugesetzt, die 1 mg dorsalen Wurzeln pro 1 ml Rohextrakt entsprach.

Schon wenige Minuten Inkubationszeit bei 37° C genügten, um die Darmwirksamkeit der Rohextrakte zum Verschwinden zu bringen. Hinterwurzel- und Rückenmarksextrakte sowie Substanz P wurden in 3—6 min fast völlig inaktiviert, Darmextrakt etwas langsamer, doch waren auch hierbei nach 10 min nur mehr etwa 10% der Wirksamkeit vorhanden. Dieser überaus rasche enzymatische Abbau steht im Gegensatz zu der beobachteten 16—24stündigen Inkubationszeit, wie sie Hellauer u. Umrath[23] zur Inaktivierung der Ohrwirksamkeit beschrieben.

Adenosintriphosphorsäure. Die in der Einleitung erwähnte, kürzlich erschienene Mitteilung von Holton u. Holton[26], daß bei antidromer Reizung im Perfusat des Kaninchenohres ATP nachzuweisen ist, lenkte die Aufmerksamkeit auch auf ATP. Die Beständigkeit der Extrakte im schwach Sauren und die leichte Zerstörbarkeit im Alkalischen schlossen ATP von vornherein aus. Am Meerschweinchenileum zeigte ATP wechselnde Effekte, in größeren Dosen (> 10 μg/ml) meist eine Kontraktion, die allerdings durch mögliche Beimengungen von Adenosindiphosphorsäure[32] erklärt werden könnte. Während jedoch nach Zugabe von 0,2 ml n NaOH pro ml Rohextrakt bzw. Substanz P-Lösung und Erhitzen auf 100° C nach 30 min in sämtlichen Extrakten die Wirksamkeit am Darm verschwunden war, blieb die Wirksamkeit einer ATP-Lösung (100 μg/ml) voll erhalten. Am denervierten Kaninchenohr ist durch ATP bei intracutaner Injektion eine Rötung zu erzielen, die ungefähr so lange anhält, wie die Rötung durch einen Rückenmarksrohextrakt. Wenngleich die Rötung durch 1 mg ATP schwächer als die des Rückenmarksrohextraktes ist, so könnte doch bei Vorhandensein von Adenosinverbindungen in größerer Menge mit einer Beeinflussung des Kaninchenohrtestes gerechnet werden. Doch spricht schon die leichte Zerstörbarkeit des am Kaninchenohr wirksamen Agens gegen eine wesentliche Wirkung etwa beigemengter Adenosinverbindungen.

Hemmung durch d- und l-Polamidon. Schaumann u. Mitarb.[36, 37] beschrieben in den letzten Jahren eine Hemmung des Peristaltikreflexes durch Morphin und durch synthetische Analgetika, wobei anfänglich die Möglichkeit der Hemmung einer Erregungssubstanz in Erwägung gezogen worden war, was aber auf Grund der späteren Untersuchungen nur mehr als wenig wahrscheinlich bezeichnet wurde. Die Hemmung des Peristaltikreflexes erfolgte parallel zur analgetischen Wirkung

und entsprach nicht der bei einigen der untersuchten Analgetika vorhandenen spasmolytischen Wirksamkeit: So zeigte beispielsweise d-Polamidon bei gleicher spasmolytischer Wirksamkeit wie l-Polamidon nur etwa $^1/_{15}$ der analgetischen bzw. peristaltikreflexhemmenden Wirksamkeit. Da aus experimentellen Gründen eine spezifische Hemmung der Substanz P von Bedeutung wäre, wurde die hemmende Wirkung von d- und l-Polamidon auf die durch Rückenmarksextrakt bzw. 0,4 Einh. Substanz P ausgelösten Kontraktionen am atropinisierten und mit Antihistamin in der oben beschriebenen Weise vorbehandelten Meerschweinchenileum untersucht. Eine etwa 50%ige Hemmung der Kontraktionen zeigte sich erst durch etwa 1 mg/ml Morphin bzw. 50 μg/ml Dolantin bzw. 10 μg/ml d- oder l-Polamidon. Zwischen d- und l-Polamidon war kein Unterschied festzustellen. Es handelte sich somit um eine rein spasmolytische Wirkung, wodurch Schaumanns[37] Ansicht unterstützt wird, daß die Darmhemmung durch die angeführten Substanzen — zumindest insofern, als Substanz P bei der humoralen Übertragung nervöser Impulse in der Darmwand eine Bedeutung haben könnte — nicht durch einen solchen Wirkungsmechanismus vorstellbar ist.

Besprechung der Ergebnisse.

Die vorliegenden Untersuchungen sollten die Frage klären, inwieweit die gefundene Darmwirksamkeit von Hinterwurzelextrakten mit Substanz P einerseits und mit der Erregungssubstanz von Hellauer u. Umrath[22, 23, 24, 38, 39] andererseits auf einen Nenner gebracht werden könnte. Da die Erregungssubstanz bisher nicht, wie es bei Substanz P der Fall ist, in einer gereinigten Form beschrieben wurde, aber auch von Substanz P noch keine chemische Identifizierung vorliegt, konnte ein Vergleich nur an Hand der Untersuchung möglichst vieler physikalischer, chemischer und biologischer Charakteristika erfolgen. Was diese betrifft, so handelt es sich im wesentlichen um 3 biologische Wirkungen, nämlich erstens um die Rötung des denervierten Kaninchenohres, zweitens um die Kontraktion des Meerschweinchenileums unter Atropin und Anthistamin und drittens um die Blutdrucksenkung.

Das erste Kriterium ist von besonderem Wert, weil es als Wirkung am Axonreflex aufgefaßt werden kann und somit den noch am ehesten spezifischen Nachweis einer Erregungssubstanz sensibler Nerven bietet. Die geringe Rötung durch Vorderwurzelextrakte und das Verschwinden der Rötung nach entsprechender Vorbehandlung der Hinterwurzelextrakte unterstreicht diese Deutung, während die stark rötende Wirkung von Darmextrakten, die mögliche Beeinflussung durch unspezifisch capillarerweiternde Substanzen und die Schwierigkeit einer quantitativen Auswertung als Nachteile der Methode gelten müssen.

Die Reaktion am zweiten Testobjekt, nämlich am Darm, welche von Feldberg u. Mitarb.[5] in der angegebenen Form schon per exclusionem als Substanz P gewertet wird, bietet neben der genauen Quantitätsbestimmung den Vorteil einer sehr empfindlichen und leicht durch-

führbaren Untersuchung, die nur wenig durch andere Faktoren beeinflußt werden kann*.

Die dritte biologische Wirkung, nämlich die Blutdrucksenkung, welche in letzter Zeit hauptsächlich von HOLTON u. HOLTON[25] untersucht worden war, zeigt zumindest in Rohextrakten, daß sie, obwohl immer vorhanden, so doch sicherlich nicht auf den am Darm festgestellten Gehalt an Substanz P zurückzuführen ist, somit in den Rohextrakten zumindest nicht auf eine einzige Substanz bezogen werden kann.

Im Vergleich mit *Substanz P* ergaben sich identische Ergebnisse hinsichtlich der Löslichkeit, p_H-Beständigkeit, Dialysierbarkeit, Fällungsmöglichkeiten, enzymatischer Zerstörbarkeit und papierchromatographischer Wanderung. Sie stimmen hinsichtlich Alkohollöslichkeit, p_H-Stabilität und Dialyse mit den von HELLAUER[22] am Kaninchenohr getesteten Eigenschaften von Extrakten aus dorsalen Wurzeln überein. Die von v. EULER stammende Substanz P, welche nach seiner Mitteilung aus Darm gewonnen worden war, verhielt sich in allen Belangen ebenso wie die Extrakte aus Rückenmark, Darm und dorsalen Wurzeln. Da über die Identität der Substanz P aus Darm und aus Gehirn keine genaueren Angaben vorliegen, wurde dieser Frage besondere Aufmerksamkeit geschenkt; doch konnte, abgesehen von der etwas größeren p_H-Beständigkeit der Darmextrakte im Alkalischen, was allein noch als kein Unterschied gewertet werden darf, kein Hinweis auf eine Verschiedenheit gefunden werden.

Bei der Frage der Abgrenzung gegen andere bereits bekannte Substanzen standen vor allem *Histamin* und *Adenosintriphosphorsäure* im Vordergrund. Die Tatsache, daß gerade der sonst für die Bestimmung von Histamin bevorzugte unterste Abschnitt des Meerschweinchenileums auch für Substanz P so besonders empfindlich ist, ließ die Frage aufwerfen, ob dies auf eine mögliche nähere strukturelle Beziehung hinweisen könnte. Doch ist dieser Darmabschnitt beispielsweise auch besonders acetylcholinempfindlich, so daß es sich wohl in erster Linie um einen mangels Spontanrhythmik und infolge ziemlich dünner Muskelschichten für Austestungen so besonders geeigneten, an und für sich sehr empfindlichen Darmabschnitt handelt. Histaminbestimmungen in

* *Anmerkung bei der Korrektur:* Kürzlich haben FELDBERG u. TOH (J. of. Physiol. **119**, 352 [1953]) sowie GADDUM (J. of. Physiol. **119**, 363 [1953]) angegeben, daß der Ausschluß von Serotonin bei Testung von Rohextrakten am Meerschweinchendarm unter Atropin und Antihistamin durch Desensibilisierung des Darmes mittels einer hohen Dosis Serotonin (40 μg/ml) erfolgen kann. In diesem Sinne haben wir Vorder- und Hinterwurzelextrakte geprüft, wobei sich nach 50 μg/ml Serotonin keine Abnahme ihrer Wirkung zeigte, und konnten damit einen zusätzlichen Beweis zur Abgrenzung von Substanz P gegen Serotonin in Hinterwurzelextrakten erbringen.

ventralen und dorsalen Wurzeln ergaben durchwegs praktisch gleiche Werte, obwohl zwischen den Befunden von Kwiatkowski[30] und den neueren Untersuchungen von Werle[43, 44] bedeutende Unterschiede bestehen.

Der Erstgenannte extrahierte nach Barsoum u. Gaddum[1] Wurzeln von Kaninchen, Katzen und Hunden, während Werle[43, 44] Wurzeln vom Rind mit 10%-iger Salzsäure extrahierte und in den Wurzeln 2,2 μg/g, im Spinalganglion jedoch 46 μg/g Histamin fand. Die in den eigenen Versuchen verwendeten Hinterwurzeln stammten ausnahmslos aus den intradural, d. h. beim Rind proximal vom Spinalganglion gelegenen Abschnitten. Nach Behandlung mit Antihistamin (Bridal, Antistin) und Histaminase, die Werle selbst hergestellt hatte, wurde die von ihm beschriebene Restaktivität nicht unterschiedlich gefunden, was jedoch durch die Zerstörung der Substanz P bei seiner stark sauren Extraktion erklärt werden kann.

Die Anwendung von ATP ergab an leicht kontrahierten Darmstücken eine prompte Erschlaffung, führte aber andererseits in Dosen über 10 μg/ml zu Kontraktionen, wie sie ähnlich besonders mit Adenosindiphosphorsäure schon von Gillespie[19] erwähnt wurden. Doch schloß schon die Zubereitung der Extrakte, vor allem aber die leichte Zerstörbarkeit beim Erhitzen im Alkalischen ATP aus, da in gleichzeitig erhitzten Kontrollproben ATP vollkommen erhalten blieb. Wenn Holton u. Holton[25] die Gefäßerweiterung durch Vorder- und Hinterwurzelextrakte auf ATP zurückführen und freigesetzten Adenosinverbindungen im antidrom gereizten Kaninchenohr in diesem Zusammenhang die mögliche Rolle als „sensory transmitter" zusprechen, kann man wohl dagegen die von Gaddum[16] geäußerte Ansicht ins Feld führen, daß nämlich bei der antidromen Reizung von sensiblen Nerven sowohl für die Freisetzung von Acetylcholin als auch von Histamin Beweise vorliegen, doch wahrscheinlich keine dieser beiden Substanzen für die Gefäßerweiterung verantwortlich und damit auch ihre Rolle als Erregungssubstanzen sensibler Nerven noch nicht entschieden ist.

In diesem Zusammenhang ist vor allem ein Vergleich bzw. eine Abgrenzung gegen die von Hellauer u. Umrath[23, 24, 38, 39] beschriebene „Erregungssubstanz sensibler Nerven" von besonderer Bedeutung: Zunächst stand im Vordergrund die Auffindung einer zweiten biologischen Reaktion, welche mit Hinterwurzelextrakten um ein Vielfaches stärker als mit Vorderwurzelextrakten auszulösen war und nicht auf eine bisher identifizierte Substanz zurückgeführt werden konnte. Die Untersuchung der p_H-Beständigkeit, der Dialysierbarkeit und der Alkohollöslichkeit ergab Ähnlichkeit mit der „Erregungssubstanz sensibler Nerven". Die weiteren Vergleiche der nach Fällung gereinigten Fraktionen am Kaninchenohr sowie die Wirksamkeit der Papierchromatogrammfraktionen sprechen ebenfalls für eine weitgehende Ähnlichkeit. Der enzymatische Abbau durch Inkubieren mit Hinterwurzelfrischextrakt erfolgt bei Extrakten aus dorsalen Wurzeln bzw. aus dem Rückenmark und bei Substanz P gleich rasch, bei Darmextrakt etwas langsamer. Demgegenüber war in den Versuchen von Hellauer u. Umrath[23] ein Verschwinden der Ohrwirksamkeit erst nach 16 Std festzustellen. Dies könnte damit erklärt werden, daß die Darmwirksamkeit auf eine Vorstufe oder die Ohrwirksamkeit auf ein Abbauprodukt zurückzuführen ist. Allerdings fand

Hellauer[22] vor kurzem unter Anwendung der Darmtestung, daß bei kurzem Erhitzen im Alkalischen die Darmwirksamkeit erst nach der rötenden Wirkung am Kaninchenohr verschwindet. Dieser Befund zeigt, daß die Darmwirksamkeit zumindest etwas beständiger ist, doch läßt das noch keinen Schluß auf eine eventuelle größere physiologische Bedeutung einer dieser beiden Wirkungen zu. Wie groß auch immer die Ähnlichkeit sein möge, wird ein derartiger Vergleich stets mit Schwierigkeiten verbunden sein, solange nicht wenigstens eine der beiden Wirkungen auf einen chemisch definierten Stoff zurückgeführt werden kann, da ein abweichendes Ergebnis zweier biologischer Teste mit wenig gereinigten Extrakten sowohl durch eine tatsächliche Verschiedenheit als auch durch (eines der beiden Untersuchungsobjekte beeinflussende) Begleitsubstanzen bedingt sein kann.

Dieser Vergleich stellt die Frage nach der bisher nur im Hinblick auf die Darmwirksamkeit betrachteten Bedeutung der Substanz P in ein neues Licht. Während die Untersuchung der Erregungssubstanz eines efferenten Neurons durch die ausgelöste Muskel- oder Drüsentätigkeit experimentell leicht erfaßbar ist, stellen sich den entsprechenden Untersuchungen am ersten afferenten Neuron mangels leicht registrierbarer Äußerungen große Schwierigkeiten entgegen, so daß zunächst die Untersuchung von Inhaltsstoffen sensibler Nerven und deren Vergleich mit motorischen aussichtsvoll erschien. Gleichzeitig mit der Analyse der Substanz P als Erregungssubstanz sensibler Nerven drängte sich die Erwägung eines nicht-cholinergen Überträgerstoffes im Zentralnervensystem auf, eine Frage, die von Feldberg u. Vogt[12] zuerst aufgeworfen worden ist und vor allem in Hinblick auf reflektorische Hemmungen von besonderer theoretischer Bedeutung wäre[11]. Die in unserem Institute von Kopera u. Lazarini[28] über die Verteilung der Substanz P im Zentralnervensystem unternommenen Untersuchungen weisen ebenfalls in diese Richtung.

Zusammenfassung.

Extrakte aus dorsalen Wurzeln verursachen am isolierten Meerschweinchenileum eine Kontraktion, die nicht auf Acetylcholin-, Histamin- und ATP-Wirkung zurückzuführen ist, vielmehr gegen diese abgegrenzt werden konnte. Eine derartige Wirkung ist in Extrakten aus ventralen Wurzeln, wenn überhaupt vorhanden, nur angedeutet.

Bezüglich dieser Wirkung am Darm wurden Extrakte aus dorsalen Wurzeln einerseits mit Substanz P, andrerseits mit der „Erregungssubstanz sensibler Nerven“ verglichen:

a) Die Löslichkeitsverhältnisse, Dialysierbarkeit und p_H-Stabilität sind bei beiden Substanzen übereinstimmend.

b) Die Wirksamkeit der Fällungen ist analog der Substanz P und erweist sich auch am Kaninchenohr als positiv.

c) Papierchromatographische Untersuchungen zeigen mit Substanz P übereinstimmende Rf-Werte, in Rohextrakten war außer der Darmwirksamkeit bei niederen Rf-Werten auch eine solche bei höheren Rf-Werten nachweisbar.

d) Blutdruckversuche mit Rohextrakten ergaben, daß neben der Substanz P noch ein anderer, nicht für die dorsalen Wurzeln spezifischer, blutdrucksenkender Stoff anzunehmen ist.

e) Substanz P, Extrakte aus dorsalen Wurzeln, Rückenmark und Darm konnten durch ein in den dorsalen Wurzeln enthaltenes Enzym abgebaut werden.

Der Nachweis der Substanz P in den dorsalen Wurzeln sowie ihre weitgehende Ähnlichkeit mit der „Erregungssubstanz sensibler Nerven" lassen ihre Bedeutung als Überträgerstoff des ersten sensiblen Neurons als möglich erscheinen.

Literatur.

[1] Barsoum, G. S., u. J. H. Gaddum: J. of Physiol. **85**, 1 (1935). — [2] Bjurstedt, H., U. S. v. Euler u. B. Gernandt: Scand. Arch. Physiol. **83**, 257 (1940). — [3] Crawford, T. B. B., u. A. S. Outschoorn: Brit. J. Pharm. **6**, 8 (1951). — [4] Dale, H. H.: Proc. Roy. Soc. Med. **28**, 319 (1935). — [5] Douglas, W., W. Feldberg, W. D. M. Paton u. M. Schachter: J. of Physiol. **115**, 163 (1951). — [6] Erspamer, V., u. G. Boretti: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 296 (1951). — [7] Euler, U. S. v.: Scand. Arch. Physiol. **73**, 142 (1936). — Arch. exper. Path. u. Pharm. **181**, 181 (1936). — [8] Euler, U. S. v.: Acta physiol. Scand. **4**, 373 (1942). — [9] Euler, U. S. v., u. J. H. Gaddum: J. of Physiol. **72**, 74 (1931). — [10] Feldberg, W.: J. of Physiol. **101**, 432 (1943). — [11] Feldberg, W.: Proc. Roy. Soc. Biol. Ser. B **140**, 199 (1952). — [12] Feldberg, W., u. M. Vogt: J. of Physiol. **107**, 372 (1948). — [13] Fischer, H., u. W. Vogt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 91 (1950). — [14] Florey, E.: Z. vergl. Physiol. **33**, 327 (1951). — [15] Freyburger, W. A., B. E. Graham, M. M. Rapport, P. H. Seay, W. M. Govier, O. F. Swoap u. M. J. Vander Brook: J. of Pharmacol. **105**, 80 (1952). — [16] Gaddum, J. H.: Acta neurovegetat. **4**, 268 (1952). — [17] Gaddum, J. H., u. H. O. Schild: J. of Physiol. **83**, 1 (1934/35). — [18] Gernandt, B.: Acta Physiol. Scand. **3**, 270 (1942). — [19] Gillespie, J. H.: J. of Physiol. **80**, 345 (1934). — [20] Gullbring, B.: Acta Physiol. Scand. **6**, 246 (1943). — [21] Häusler, H. F., u. H. F. Hellauer: Wien. med. Wschr. **100**, 40 (1950). — [22] Hellauer, H. F.: Arch. exper. Path. u. Pharmokol. **219**, 234 (1952). — [23] Hellauer, H. F., u. K. Umrath: Pflügers Arch. **249**, 619 (1948). — J. Physiol. **106**, 20 P (1947). — [24] Hellauer, H. F., u. K. Umrath: Z. Vitamin-Hormon-Fermentforschg, Wien **3**, 244 (1950). —[25] Holton, F. A., u. P. Holton: J. of Physiol. **116**, 35 P (1951). — [26] Holton, F. A., u. P. Holton: J. of Physiol. **118**, 18 P (1952). — [27] Holton, P., u. W. D. M. Perry: J. of Physiol. **114**, 240 (1951). — [28] Kopera, H., u. W. Lazarini: Arch. exper, Path. u. Pharmakol. **219**, 214 (1953). — [29] Kuck, H., u. W. Vogt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **209**, 71 (1950). — [30] Kwiatkowski, H.: J. of Physiol. **102**, 32 (1943). — [31] Loewi, O., u. H. Hellauer:

Pflügers Arch. **240**, 769 (1938). — [32] McIntosh, F. C.: J. of Physiol. **99**, 436 (1941). — [33] Pernov, B.: Acta Physiol. Scand. **24**, 97 (1951). — [34] Roche e Silva, M., W. T. Beraldo u. G. Rosenfeld: Amer. J. Physiol. **156**, 261 (1949). — [35] Roche e Silva: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 271 (1951). — [36] Schaumann, O., H. Giovannini u. K. Jochum: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 460 (1952). — [37] Schaumann, O.: Arch. exper. Path. u, Pharmakol. (im Druck). — [38] Umrath, K.: Z. Vitamin-Hormon-Fermentforschg, Wien **1**, 424 (1947/48). — [39] Umrath, K., u. H. F. Hellauer: Pflügers Arch. **250**, 737 (1948). — [40] Vogt, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 31 (1950). — [41] Werle, E., R. Kehl u. K. Roebke: Biochem. Z. **230**,136 (1950). — [42] Werle, E., u. U. Berek: Biochem. Z. **320**, 372 (1950). — [43] Werle, E., u. G. Weicken: Biochem. Z. **319**, 457 (1949). — [44] Werle, E., u. D. Palm: Biochem. Z. **320**, 322 (1950).

Dr. F. Lembeck, Pharmakologisches Institut der Universität Graz/Österreich.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 214—222 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. Häusler).

Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse.

IV. Mitteilung.

Die Verteilung der Substanz P im Zentralnervensystem*.

Von
H. Kopera und W. Lazarini.

(Eingegangen am 6. März 1953.)

Über das Vorkommen der Substanz P [5, 6, 10] im Gehirn erwähnt nur Gullbring [11] einen höheren Gehalt in den Basalgangliengebieten. Eine systematische Untersuchung über ihre Verteilung könnte zur Beantwortung der Frage führen, ob die Substanz P in allen Teilen des Gehirnes in der gleichen Konzentration zu finden ist, was gegen eine spezifische Bedeutung sprechen würde, oder ob eine besondere Lokalisation vorliegt.

Letztere Möglichkeit mußte in Gegenüberstellung zu der einzelne Gehirnpartien betreffenden Verteilung, etwa von Acetylcholin [18], Cholinacetylase [9], Histamin [16, 24, 25], O_2-Aufnahme [19], von besonderem Interesse sein, vor allem bei einem Vergleich von Kern- mit Leitungsgebieten. Ferner war die besonders in Hinblick auf die Untersuchungen von Hellauer u. Umrath [14, 15, 22, 23] wichtige Frage, ob es sich dabei um eine Aktionssubstanz sensibler Neurone handelt, beachtenswert; hierbei schien schon unter Berücksichtigung der von Feldberg u. Vogt [9] in Erwägung gezogenen „alternierenden Transmission" eine Beschränkung auf ausschließlich afferente Bahnen zu eng. Nicht zuletzt mußte die Möglichkeit des Zusammenspiels cholinerger und nichtcholinerger Neurone in Betracht gezogen werden, wenn aus den Einzelergebnissen ein übersichtliches Bild gewonnen werden sollte (vgl. Häusler [12]).

Methodik.

Unsere Versuche sind am ZNS von Rindern und Katzen angestellt worden. Die Rindergehirne wurden sofort nach der Schlachtung entnommen und in Eis gepackt ins Institut gebracht. Dort wurden möglichst rasch Proben von wenigstens 0,5 g entnommen**, mit der 3fachen Menge n/10 H_2SO_4 versetzt, mit Seesand zerrieben, etwa 5 min ins kochende Wasserbad gestellt, anschließend im Kühlschrank

* Herrn Prof. Dr. Otto Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

** Für die wertvolle Hilfe bei der Sektion der Gehirne möchten wir Herrn Dr. H. Scherrer vom Anatomischen Institut der Universität Graz unseren Dank aussprechen.

aufgehoben und erst vor der Austestung am Meerschweinchendarm, welche am gleichen und am darauffolgenden Tag erfolgte, neutralisiert. In 2 Fällen wurden Katzengehirne verwendet, die nach Tötung der Tiere durch Nackenschlag entnommen und in gleicher Weise wie die Rindergehirne aufgearbeitet wurden.

Die Bereitung der zum Vergleich verwendeten Darmextrakte aus Rinderdarm erfolgte in der von LEMBECK[17] für Rohextrakte angegebenen Weise. Darmextrakt wurde zum Vergleich herangezogen, weil davon jeweils gleich eine größere Menge hergestellt werden konnte und auch die Extrakte immer von ziemlich gleicher Wirkung waren, wie in Kontrollversuchen festgestellt worden war. Die sauren Extrakte konnten bei 2° C ohne Wirkungsverlust wochenlang aufgehoben werden. Ein solcher Darmextrakt wurde auch als „Standard" verwendet, was insofern notwendig war, als zunächst über den Gehalt der verschiedenen Partien des ZNS noch keine sicheren Angaben zur Verfügung standen. Der als Standard verwendete Darmextrakt wurde alle 3 Wochen mit einem frisch bereiteten Extrakt verglichen, wobei sich jedoch, entsprechend der erwähnten Haltbarkeit, nie nennenswerte Unterschiede zeigten. Sämtliche in der Tabelle angegebenen Werte bezeichnen die Wirksamkeit von 1 g der untersuchten Gehirnpartie, bezogen auf die Wirksamkeit von 10 mg frischen Darm, also Feuchtgewebe. Die Austestung der Extrakte am Meerschweinchenileum unter Atropin und Neoantergan[3] (jeweils 1 μg/ml) erfolgte in der von LEMBECK[17] angegebenen Art.

Ergebnisse.

Da die vorliegende Untersuchung in erster Linie die Verteilung der Substanz P im Gehirn ermitteln sollte, wurde eine weitergehende Isolierung nicht versucht. Doch hatten die Untersuchungen von LEMBECK[17] den Nachweis von Substanz P in dorsalen Rückenmarkswurzeln ergeben und deren Beziehung zu der von HELLAUER u. UMRATH[13, 14, 15, 22, 23] beschriebenen „Erregungssubstanz sensibler Nerven" herstellen können. Die Bedeutung dieser Substanz wird somit in ihrer Rolle als nichtcholinerger Überträgerstoff[9, 17] vermutet, ähnlich wie andererseits auf Grund der Verteilung der Substanz P im Darm ein Zusammenhang mit der Darmmotilität vertreten wurde[4, 20].

Die Ergebnisse der Untersuchungen der einzelnen Gehirn- und Rückenmarkspartien sind in der Tabelle, der über 150 Einzelbestimmungen zugrunde liegen, zusammengestellt. Zu Vergleichszwecken wurden in den beiden ersten Kolonnen die von MCINTOSH[18] bestimmten Acetylcholinmengen sowie die von FELDBERG u. VOGT[9] untersuchte Cholinacetylase-Aktivität aufgenommen. In einem Versuch (Nr. 1) am atropinisierten Meerschweinchenileum wurde die Wirksamkeit von „Histamin + Substanz P" bestimmt; hier waren die verwendeten Extrakte gleichzeitig an einem zweiten Meerschweinchenileum ohne Antihistamin, d. h. nur unter Atropin gegen Histamin verglichen worden. Im Hinblick auf die Histaminbestimmungen von KWIATKOWSKI[16], der nach der Methode von BARSOUM u. GADDUM[1] extrahiert hatte, und mit Ausnahme des Kleinhirns (2 μg/g Histamin) durchwegs nur 0,1—0,3 μg/g Histamin im ZNS fand, ist anzunehmen, daß der größte Teil dieser in Histaminäquivalenten ausgedrückten Wirksamkeit der Substanz P zuzuschreiben

Tabelle.

Nr.	Region des ZNS	µg/g ACh nach McIntosh [18]	ChA-Aktivität in % Thalam. n. Feldb. u. Vogt [9]	µg/g Histamin nach Kwiatkowski [16]	µg/g e) Histamin nach Werle [24, 25]	Versuch 1 µg/g Histamin + Subst. P
1	Cortex, versch. Reg.	1,2–4,5	57–81	<0.2	–	<1.5
2	Cortex, Gyrus praectr.	–	71	–	–	–
3	Cortex, Gyrus postctr.	–	57	–	–	–
4	Fissura calcarina	–	58	–	–	–
5	Weiße Subst., Front.	0,5–1,0	–	–	(1,2)	–
6	Capsula interna	0,25–3,3	38–40	–	–	0,75
7	Striatum	2,7	–	–	– f)	–
8	Caput nucl. caudati	–	127	–	1,0	6,6
9	Nucleus lentiformis	–	–	–	–	1,1
10	Pes hippocampi	–	108	–	–	0,6
11	Corpos callosum	0,9–4,2	26	–	–	0,2, 0,3
12	Fornix	–	–	–	–	0,5
13	Thalamus	1,8–4,2	100	–	Spuren	3,0
14	Hypothalamus	1,6–2,1	–	–	–	–
15	Lamina quadrigemina	–	–	–	–	–
16	Colliculus rostralis	1,6–1,7	104	–	–	4,2, 2,0
17	Colliculus caudalis	–	44	–	–	5,4, 2,0
18	Retina	–	–	–	–	–
19	Faciculus opticus	–	5,6	–	–	–
20	Tractus opticus	0,3 (?)	35	–	11,0	1,2
21	Corpus geniculat. lat	–	105	–	–	–
22	Hypophysenhinterl.	–	7	–	6, (10)	7,5 (?)
23	Hypophysenvorderl.	–	6	–	–	0,5
24	Infundibulum	–	27	–	–	2,1
25	Epiphyse	–	–	–	–	0,9
26	Mesencephalon	–	– b)	0,28	–	9,0, 9,0
27	Crus cerebri	–	22	–	–	–
28	Tegmentum	–	–	–	–	4,2
29	Boden d. IV. Ventrik.	–	–	–	–	3,3, 2,1
30	Pyramiden	0,2	12,3	– d)	–	1,2
31	Crus medullo-cerebell.	–	–	–	–	11,4, 6,0
32	Pons	1,4–5,0	– c)	–	–	3,0, 1,1
33	Crus cerebello-cerebr.	–	–	–	– g)	3,0
34	Cerebellum, gesamt	0,18	–	1,5–2,0	–	0
35	Cerebellum, Cortex	–	8,5	–	–	0
36	Cerebellum, Nuclei	–	21	–	–	–
37	Cerebellum, Vermis	–	–	–	–	0
38	Vorderstränge	0,3–0,8	–	–	(0,15–0,2)	–
39	Hinterstränge	0,02,<0,2	–	–	(0,2 –0,6)	–
40	Seitenstränge	0,35	–	–	(0,15–0,3)	–
41	Lumbalmark, gesamt	1,0–2,5	–	<0,2	(0,15–1,0)	–
42	Ventrale Wurzeln	12,0, 18,0	236	0	(1,5 –3,0)	0,3
43	Dorsale Wurzeln	0,04,<0,1	–	0	(1,5 –3,0)	1,2

a) 0 bedeutet weniger als 5 (in Versuch 2—9).
b) Nucleus ruber: 87, Substantia nigra: 51.
c) Mittlere Kleinhirnarme: 60.
d) Medulla oblongata: <0,1 µg/g.

Tabelle.

a) Vers. 2 Rind Subst. P.	Vers. 3 Rind Subst. P.	Vers. 4 Rind Subst. P.	Vers. 5 Rind Subst. P.	Vers. 6 Rind Subst. P.	Vers. 7 Rind Subst. P.	Vers. 8 Katze Subst. P.	Vers. 9 Katze Subst. P.	Vers. 2-7 Bereich Subst. P.
–	–	<15	0	0	–	–	–	0, <15
0	10, 10, 0	–	–	–	–	–	–	0–10
0	0, 7, <10	–	–	–	–	–	–	0–7
–	0, 5, 7	–	–	–	–	–	–	0–7
–	–	<15	–	–	–	–	–	<15
–	–	10	4	–	–	–	–	4, 10
–	–	–	–	–	–	200	110	–
–	–	–	150	300	–	–	–	150, 300
–	–	30, 60	47	48	–	–	–	30, 60
–	–	–	25	–	–	–	–	25
–	–	–	–	–	–		–	–
30	–	–	15	20	–	–	–	15–30
100	–	50, 80	20	56	–	91	35	20–100
–	–	–	93	–	–	–	–	93
150	–	–	105	–	–	–	–	105, 150
–	–	80, 130	120	180	90	80	30	80–130
–	–	100, 130	105	80, 140	140	32	55	80–140
–	–	–	–	–	0	–	–	0
20	–	–	–	–	–	–	–	20
–	–	–	–	12, 18	–	–	–	12, 18
–	–	–	–	–	150	–	–	150
–	–	–	?	–	–	–	–	–
–	–	–	0	–	–	–	–	0
–	–	–	90	90	–	–	–	90
–	–	–	0	–	–	–	–	0
130	–	400	750	200	500	300	96	130–750
–	45	–	–	–	–	–	–	45
–	–	33, 40	–	240	113	–	–	33–113
–	–	–	130, 400	–	110	–	–	110–400
70	–	55	40	–	–	75	–	40–75
–	200	240	300	200	–	75	–	200–300
–	25, 25	15	22	–	–	52	–	15–25
–	–	–	100	–	–	–	–	100
0	0	–	–	–	–	5	0	0
–	–	0	0	–	–	–	–	0
–	–		–	–	–	–	–	–
–	–	0	0	–	–	–	–	0
–	–	10	–	6	–	–	–	6–10
–	–	70	–	110	320	–	–	70–320
–	–	65	–	17	–	–	–	17, 65
–	–	75	–	–	–	–	–	75
5	0, 0, 5, 5	0	–	–	–	–	–	0–5
25	20, 30	23	–	–	–	–	–	20–35
	32, 35, 35							

e) Zahlen in Klammern: Untersuchungsmaterial vom Rind, ohne Klammern: vom Menschen. – f) Großhirn (grau): (1,2). – g) Kleinhirn (weiß): (2,5), (grau): (2,0).

ist. Die Untersuchungen von Werle[24, 25] ergaben zum Teil höhere Histaminwerte, wie gleichfalls aus der Tabelle hervorgeht.

Die für die einzelnen Gehirnpartien gefundenen Werte liegen eindeutig innerhalb einer bestimmten Größenordnung, die Streuung ist allerdings oft erheblich; sie ist teilweise wohl darauf zurückzuführen, daß die Rindergehirne bei der Schlachtung durch das Ausbohren der Medulla oblongata beschädigt werden, weshalb aus einem Gehirn immer nur eine kleine Anzahl ganz unversehrter Proben entnommen werden kann. Auch die Acetylcholinbestimmungen zeigen ja oft sehr große Abweichungen, die schon damit erklärt werden könnten, daß der Gehalt in kleinen, makroskopisch nur ungenau trennbaren Gebieten sehr unterschiedlich sein kann. Als weiteres Imponderabile für die Bestimmung jeder Art von Aktionssubstanzen ist die zwischen Tötung und Präparation verstreichende Zeit zu berücksichtigen.

Trotz dieser Einschränkungen ergibt sich aus der vorliegenden Arbeit folgender eindeutige Überblick: Ähnlich dem von Lembeck[17] beschriebenen Unterschied zwischen Vorder- und Hinterwurzeln zeigten auch die Hinterstränge wesentlich mehr Wirksamkeit als die Vorderstränge. Besonders hoch war der P-Gehalt im Crus medullocerebellare, meist auch im Tegmentum mesencephali und im Thalamus. Interessanterweise enthielt die Großhirnrinde in allen ihren Teilen ausnahmslos nur sehr wenig Substanz P. Auffallend wenig war auch im Kleinhirn zu finden. Hingegen war das Mesencephalon äußerst reich daran, wobei sicherlich ein beträchtlicher Teil auf die angrenzenden Kerne des Tegmentums entfallen dürfte, da eine Bestimmung im Crus cerebri allein einen geringeren Gehalt ergab. Mittlere Mengen sind im Rückenmarksseitenstrang enthalten. Demgegenüber enthielt das Crus cerebello-cerebrale große und die Pons zumindest mittlere Mengen an Substanz P. Bei den Proben aus der Seh- und Hörbahn zeigte sich, daß der Fasciculus opticus und der Tractus opticus im Vergleich mit den Korngebieten zwar wenig, im Vergleich mit den dorsalen Wurzeln aber doch mittlere Werte enthielt. Die Vierhügelplatte, insbesondere die vorderen Vierhügel sowie das Corpus geniculatum laterale wiesen größere Mengen auf, in Fornix und Ammonshorn konnte nur wenig gefunden werden. Reich an Substanz P war noch der Nucleus caudatus, etwas geringere Mengen fanden sich im Nucleus lentiformis. Hohe Werte zeigte der Hypothalamus, wogegen in der Hypophyse, der Epiphyse sowie im Balken praktisch kein Gehalt an Substanz P festgestellt werden konnte.

Zusammengefaßt ergibt sich, daß die höchsten Substanz P-Werte gefunden werden in:

Nucleus caudatus, Thalamus, Hypothalamus, Corpus geniculatum laterale, Infundibulum, Lamina quadrigemina, Mesencephalon, Boden des IV. Ventrikels, Pyramiden, Crus medullo-cerebellare, Crus cerebello-cerebrale, Hintersträngen.

Mittlere Werte enthalten:

Nucleus lentiformis, Ammonshorn, Fornix, Fasciculus und Tractus opticus, Brücke, Seitenstränge, Hinterwurzeln.

Wenig oder nichts enthalten:

Großhirn (Rinde und weiße Substanz), Corpus callosum, Kleinhirn (Rinde und Mark), Hypophyse, Epiphyse, Vorderstränge, Vorderwurzeln, Retina.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Bedeutung der in den einzelnen Gehirnpartien festgestellten „atropin- und antihistaminresistenten" Substanz, die wir gleich LEMBECK[17] mit Substanz P in Beziehung setzen, darf wohl in einer Weise interpretiert werden, wie es FELDBERG u. VOGT[9] bei der Besprechung ihrer Untersuchungen über die Cholinacetylase-Aktivität einzelner Gehirnabschnitte getan haben, dies um so mehr, als wir eindeutige Ergebnisse erhielten, obgleich wir Mindestmengen von 0,5 g, nach Möglichkeit aber einige Gramm Gewebe entnehmen mußten und daher nicht so genau spezifizieren konnten, wie dies FELDBERG u. VOGT[9] möglich war. Da die Untersuchungen im Hinblick auf eine mögliche Bedeutung der Substanz P für die Funktion bestimmter Teile des ZNS vorgenommen wurden, mußten auch die von FELDBERG[7, 8] dargelegten Grundsätze berücksichtigt werden: In Partien, in denen reine Leitungsbahnen vorliegen, wie etwa in den Rückenmarkswurzeln, mußte sich ermitteln lassen, ob nur Substanz P-haltige Fasern, nur cholinerge oder ein Gemisch beider vorliegt.

Wesentlich komplizierter liegen die Verhältnisse in den Kerngebieten: Sowohl bei cholinerg-cholinergen Synapsen, als auch bei cholinerg-nichtcholinergen Synapsen findet man in den entsprechenden Ganglien bzw. Kerngebieten hohe Acetylcholinwerte. In den nichtcholinerg-cholinergen Synapsen ist zumindest durch den Anfangsteil der dort entspringenden cholinergen Fasern ein gewisser Acetylcholin-Gehalt gegeben. Ferner muß auch noch der Gliareichtum in diesen Gebieten und das Ausmaß der Myelinisierung ins Gewicht fallen; denn in Gebieten mit vorwiegend grauer Substanz sind nicht nur die Zellkörper, sondern auch die Anfangsteile der Neuriten enthalten.

Der Gehalt an Substanz P in reinen Leitungsgebieten, die sicher nicht cholinerg sind wie beispielsweise in den Hinterwurzeln, im Fasciculus opticus oder in den Pyramiden, ist im Vergleich mit den Kerngebieten nicht einmal so hoch. Vielmehr sind die Kerngebiete, wie etwa das Mesencephalon, der Boden der Rautengrube oder der Nucleus lentiformis, sehr reich an Substanz P. Die Frage, ob die nichtcholinergen Bahnen größere Mengen an Substanz P enthalten, kann zumindest in bezug auf die hinteren Rückenmarkswurzeln, die Pyramiden, den Tractus opticus und die Rückenmarksseitenstränge bejaht werden.

Durch einen Vergleich der Cholinacetylase- und der Substanz P-Werte in verschiedenen Kerngebieten ließe sich die Annahme für den Übergang „cholinerg" in „nichtcholinerg" oder umgekehrt in den vorderen und hinteren Vierhügeln, im Corpus geniculatum laterale, im Nucleus caudatus sowie im Nucleus ruber und in der Substantia nigra vertreten. Hingegen sind die verschiedenen Gebiete der Rinde und des Kleinhirnes auffallend arm an Substanz P, so daß sie in diesen Gebieten kaum mehr nachweisbar ist. Andererseits enthalten die vorderen und hinteren Kleinhirnstiele (Crus medullo-cerebellare und Crus cerebello-cerebrale) große Mengen an Substanz P, die Brücke nur mittlere. Während aber die Rinde reich an Acetylcholin ist, findet sich im Kleinhirn nur wenig und auch wenig Cholinacetylase.

Der gleichzeitig geringe Gehalt an Substanz P ließe sich vielleicht durch Annahme eines an und für sich geringeren „Aktivitätszustandes" verstehen: Richter u. Crossland[21] haben festgestellt, daß nach elektrischer Reizung ein Sturz des Gehirnacetylcholins auftritt und daß die durch den elektrischen Reiz hervorgerufenen Krämpfe mit der Erschöpfung des Acetylcholins aufhören. Um der Frage des Aktivitätszustandes näherzukommen, sind im Institut Versuche über den Einfluß verschiedener Todesarten u. ä. auf den P-Gehalt des Gehirnes im Gang. In diesem Zusammenhang ist es ferner bemerkenswert, daß zwischen den einzelnen Gehirngebieten erhebliche Unterschiede in der Gewebsatmung bestehen (Opitz[19]): Im allgemeinen atmet die graue Substanz in vitro stärker als die weiße. Die von Dixon u. Meyer[2] angegebenen Werte für die Gehirnatmung zeigen nun, daß Stellen mit geringem P-Gehalt, wie Cortex cerebri und cerebelli, eine hohe, Stellen mit hohen P-Werten, z. B. Thalamus, nur eine geringe Gewebsatmung haben.

Bei der Verfolgung der motorischen Bahnen fällt zunächst der geringe Gehalt in der Rinde und in der Capsula interna auf, sind doch die Kerne des extrapyramidalen Systems und die Pyramiden in der Höhe des Hirnstammes sehr reich an Substanz P. Die Verteilung der P-Aktivität im Rückenmark läßt auf nur sehr wenige P-haltige Elemente in den Vordersträngen, hingegen auf reichliche in den Seiten- und Hintersträngen schließen.

Die afferenten Bahnen dagegen lassen einen Zusammenhang mit der Substanz P erkennen; denn beginnen bereits die Hinterwurzeln mit viel Substanz P, so schließen sich daran die ebenfalls P-reichen, aber acetylcholinarmen Hinterstränge, das Tegmentum und der Thalamus. Auch die afferenten Kleinhirnbahnen im Crus medullo-cerebellare zeigen sehr hohe Werte an Substanz P.

In diesem Zusammenhang erscheint die von Hellauer u. Umrath[13, 14, 15, 22, 23] zuletzt gewählte Bezeichnung „Erregungssubstanz sensibler Nerven" insofern berechtigt, als ja am ersten sensiblen Neuron zunächst die wichtigsten Ergebnisse erzielt wurden. Doch würde eine Verallgemeinerung auf andere oder womöglich alle afferenten Bahnen eine a priori ungerechtfertigte Festlegung bedeuten, da man z. B. gleich

die nicht als cholinerg anzusehende Pyramidenbahn ausschließen müßte, ganz abgesehen von der in einer solchen Generalisierung liegenden Unterschätzung der Kompliziertheit zentraler Übertragungen. Ebenso ist derzeit, worauf bereits LEMBECK[17] hingewiesen hat, trotz vieler bestehender Ähnlichkeiten eine Identifizierung der Substanz P mit dem von HELLAUER u. UMRATH[13, 14, 15, 22, 23] beschriebenen Stoff naturgemäß nicht möglich, solange beide chemisch noch nicht aufgeklärt sind; dies um so weniger als auch die Frage, ob die Substanz P des Darmes mit der des Gehirnes identisch ist, noch endgültiger Entscheidung bedarf. So muß beispielsweise hinsichtlich des Vergleiches mit der „Erregungssubstanz sensibler Nerven" die Möglichkeit offen gelassen werden, ob nicht die eine vielleicht ein Abbauprodukt oder eine Vorstufe der anderen ist, worauf etwa die verschieden rasch eintretende Wirkung am Darm und am Kaninchenohr (LEMBECK[17]) einen Hinweis geben könnte. Hierzu kommt noch folgendes: Da für das Vorhandensein eines die Substanz P abbauenden Enzyms Beweise vorliegen (GULLBRING[11], HELLAUER u. UMRATH[13, 14, 15, 22, 23], LEMBECK[17]), muß bei der verschiedenen regionären Verteilung der Substanz P im ZNS auch an dieses Moment gedacht werden.

Die bisherigen Ausführungen haben immer wieder — nicht nur hinsichtlich der topischen Verhältnisse — zu einem Vergleich mit dem Acetylcholin geführt, für welches abbauende Enzyme bekannt sind. An die durch Alter, Species, Aktivitätszustand und dergleichen bedingten Streuungen bei der Acetylcholin- und Cholinacetylasebestimmung erinnern auch die regionären Schwankungen der P-Werte, die jedoch in ähnlicher Weise auch in unseren Untersuchungen einen für jede Partie des ZNS charakteristischen Gehalt zeigten; verglichen jedenfalls mit den Konzentrationsunterschieden in verschiedenen Darmabschnitten sind die Differenzen im Substanz P-Gehalt im Gehirn bedeutend größer.

Die Annahme einer zweiten Erregungssubstanz im ZNS eröffnet eine Reihe von Problemen, die bereits von FELDBERG u. VOGT[9] mit der Forderung einer „alternierenden Transmission" angedeutet worden sind.

Zusammenfassung.

1. Die Verteilung der Substanz P in verschiedenen Teilen des Zentralnervensystems (ZNS) von Rindern und Katzen wurde am isolierten Meerschweinchenileum unter Atropin und Antihistamin untersucht.

2. Die Substanz P zeigte im ZNS eine charakteristische Verteilung, wobei einzelne Gebiete nur sehr wenig enthalten (Großhirnrinde und weiße Substanz, Balken, Kleinhirnrinde und -mark, Hypophyse, Epiphyse, Vorderstränge, Vorderwurzeln, Retina), andere hingegen mittlere Mengen (Nucleus lentiformis, Ammonshorn, Fornix, Fasciculus und Tractus opticus, Brücke, Seitenstränge, Hinterwurzeln), während sich

große Mengen in Nucleus caudatus, Thalamus, Hypothalamus, Corpus geniculatum laterale, Infundibulum, Lamina quadrigemina, Mesencephalon, Boden des IV. Ventrikels, Pyramiden, Crus medullo-cerebellare, Crus cerebello-cerebrale und in den Hintersträngen finden.

3. Auf Grund dieser charakteristischen Verteilung wird die Ansicht diskutiert, ob die Substanz P, auf deren Ähnlichkeit mit der „Erregungssubstanz sensibler Nerven" hingewiesen wird, als „nichtcholinerger Überträgerstoff" im ZNS in Betracht gezogen werden kann.

Literatur.

[1] Barsoum, G. S., u. J. H. Gaddum: J. of Physiol. **85**, 1 (1935). — [2] Dixon, T. F., u. A. Meyer: Biochemic. J. **30**, 1577 (1936). — [3] Douglas, W., W. Feldberg, W. D. M. Paton u. M. Schachter: J. of Physiol. **115**, 163 (1951). — [4] Euler, U. S. v.: Scand. Arch. Physiol. **73**, 142 (1936). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 181 (1936). — [5] Euler, U. S. v.: Acta Physiol. Scand. **4**, 373 (1942). — [6] Euler, U. S. v., u. J. H. Gaddum: J. of Physiol. **72**, 74 (1931). — [7] Feldberg, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 64 (1950). — [8] Feldberg, W.: Proc. Roy. Soc. Biol. **140**, 199 (1952). — [9] Feldberg, W., u. M. Vogt: J. of Physiol. **107**, 372 (1948). — [10] Gaddum, J. H., u. H. O. Schild: J. of Physiol. **83**, 1 (1934/35). — [11] Gullbring, B.: Acta Physiol. Scand. **6**, 246 (1943). — [12] Häusler, H. F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck). — [13] Hellauer, H. F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 234 (1953). — [14] Hellauer, H. F., u. K. Umrath: Pflügers Arch. **249**, 619 (1948). — J. of Physiol. **106**, 20 P (1947). — [15] Hellauer, H. F., u. K. Umrath: Z. VitaminHormon-Ferm.forschg., Wien **3**, 244 (1950). — [16] Kwiatkowski, H.: J. of Physiol. **102**, 32 (1943). — [17] Lembeck, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 197 (1953). — [18] McIntosh, F. C.: J. of Physiol. **99**, 436 (1941). — [19] Opitz, E.: 3. Coll. Ges. physiol. Chem. **4**, 66 (1952). — [20] Pernov, B.: Acta Physiol. Scand. **24**, 97 (1951). — [21] Richter, D., u. J. Crossland: Amer. J. Physiol. **159**, 247 (1949). — [22] Umrath, K.: Z. Vitamin-Hormon-Ferm.forschg., Wien **1**, 424 (1947/48). — [23] Umrath, K., u. H. F. Hellauer: Pflügers Arch. **250**, 737 (1948). — [24] Werle, E., u. G. Weicken: Biochem. Z. **319**, 457 (1949). — [25] Werle, E., u. D. Palm: Biochem. Z. **320**, 322 (1950).

Dr. H. Kopera, Pharmakol. Institut der Universität Graz/Österreich.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 223—233 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin.

Der Acetylcholingehalt des Gehirns bei verschiedenen Funktionszuständen.*

Von

HANS HERKEN und DIETHER NEUBERT.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. März 1953.)

Acetylcholin wurde im Zentralnervensystem von Warmblütern mit chemischen und biologischen Methoden einwandfrei nachgewiesen. Diese Befunde gaben den Anlaß zu einer großen Zahl von Untersuchungen, die sich mit der Bedeutung dieser Substanz für den Ablauf zentralnervöser Funktionen befaßten. Sowohl erregende als auch hemmende zentrale Wirkungen des Acetylcholins wurden beschrieben. Die komplizierte funktionelle Struktur des Zentralnervensystems und die großen Unterschiede in der Empfindlichkeit der verschiedenen zentralen Regionen erschwerten die Deutung der Befunde, so daß bis heute noch kein endgültiger Beweis vorliegt, ob Acetylcholin für Funktionsänderungen im Zentralnervensystem die gleiche Bedeutung hat, die O. LOEWI bei seinen grundlegenden Untersuchungen über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung entdeckt hat. So war es verständlich, daß eine Arbeit von D. RICHTER u. J. CROSSLAND viel Beachtung fand, in der Zusammenhänge zwischen Funktionsänderungen des Gehirns und seinem Gehalt an Acetylcholin mit besonderer Methodik ermittelt wurden. Die Verfasser töteten die Versuchstiere durch Einbringen in flüssige Luft, wobei sie den Vorteil des Verfahrens in der schnellen Fixierung des Gehirns und dem damit verbundenen schlagartigen Stillstand aller fermentativen Vorgänge in den Gehirnzellen sahen.

Im Zusammenhang mit unseren eigenen Untersuchungen über die chemische Differenzierung der Wirkung von Krampfgiften mit Hexachlorcyclohexanen (H. HERKEN, H. KEWITZ, I. KLEMPAU, 1952) interessierte besonders die Feststellung, daß RICHTER u. CROSSLAND im Krampfzustand sehr niedrige Acetylcholinwerte des Gehirns fanden. Sie wurden von den Autoren so gedeutet, daß die Synthese des Acetylcholins mit dem Verbrauch während der Krämpfe nicht Schritt hält. Die Konvulsionen sollen dadurch zum Stillstand kommen, daß Acetylcholin nicht mehr in genügender Menge zur Verfügung steht. Demnach

* Herrn Prof. Dr. O. LOEWI zum 80. Geburtstage gewidmet.

wäre diese Überträgersubstanz der Nervenerregung für das Zustandekommen der generalisierten Krämpfe unbedingt notwendig.

Auf Grund ihrer Acetylcholinanalysen des Gehirns normaler und pathologisch erregter Tiere haben Richter u. Crossland eine Kurve zusammengestellt, nach der es nicht nur während des Krampfes, sondern auch schon vorher im Laufe eines einige Sekunden anhaltenden Latenzstadiums zu einem vorübergehenden Absinken der Acetylcholinwerte im Gehirn elektrisch geschockter Versuchstiere kommt. Merkwürdigerweise hat dieser Befund bisher keinen Widerspruch erregt, obwohl die vorliegenden Erfahrungen mit dem Elektroschock an Ratten gegen das Vorkommen eines solchen Latenzstadiums sprachen. Wir selbst haben dieses Phänomen nie beobachten können.

Bevor auf die eigenen Untersuchungen über den Acetylcholingehalt des Gehirns nach Einwirkung verschiedener Krampfgifte und des Elektroschocks eingegangen wird, schien es notwendig, zuerst die von Richter u. Crossland benutzte Methode, die Tötung der Versuchstiere mit flüssiger Luft, einer Überprüfung zu unterziehen. Hier wird vor allem die Frage zu beantworten sein, ob das Arbeiten mit flüssiger Luft die Ausschaltung fermentativer Vorgänge und die Erhaltung des freien Acetylcholins, auf die es im wesentlichen ankommt, garantiert. Bei der besonderen Geschwindigkeit, mit der Acetylcholin hydrolysiert wird, ist die Beeinflussung synthetischer Vorgänge zunächst von untergeordneter Bedeutung. Richter u. Crossland geben selbst eine Zeit von 4 sec an, um das Gehirn von Ratten auf 0° abzukühlen. Hierbei ist es fraglich, ob diese Abkühlung ausreicht, um die Cholinesterase des Gehirns völlig zu inaktivieren. Bei dem gleichen Ferment aus Erythrocyten genügt die Abkühlung auf 0° nicht, wie wir selbst feststellen konnten. Nun gehört aber gerade die Cholinesterase zu den Enzymen, die Acetylcholin mit äußerst hoher Geschwindigkeit hydrolysieren.

Von Rothenberg u. Nachmansohn wurde die Umwandlungszahl für eine Enzymlösung aus elektrisch aktivem Gewebe mit etwa 2 Mill./min angegeben. Sie berechneten daraus, daß 1 Enzym-Molekül 1 Molekül Acetylcholin in etwa 3—4 Mikrosekunden spaltet. Auch E. Opitz hat bei seinen Versuchen darauf aufmerksam gemacht, daß mehrere Sekunden notwendig sind, um das Gehirn auf 0° abzukühlen. J. Crossland glaubte den Beweis für die bessere Eignung der Methode dadurch erbracht zu haben, daß er bei Tötung der Versuchstiere mit flüssiger Luft unter bestimmten Bedingungen höhere Acetylcholinwerte im Gehirn normaler Versuchstiere fand als bei den älteren Verfahren.

Da uns dies auf Grund der eben angeführten Untersuchungen unwahrscheinlich schien, haben wir vergleichende Untersuchungen über den Acetylcholingehalt normaler Versuchstiere bei Anwendung der beiden von Crossland benutzten Methoden unternommen.

Unsere Versuche wurden an Ratten verschiedener Gewichtsklassen ausgeführt. Es wurde jedoch darauf geachtet, daß die Gewichte der Tiere einer Gruppe möglichst gut übereinstimmten. Bei 130 g schweren Tieren schienen uns Abweichungen von $\pm$ 7 g, bei 80 g schweren Ratten

von $\pm$ 3 g und bei den Tieren von 40 g etwa $\pm$ 2 g tragbar. Um die Streuung der Versuchsergebnisse möglichst klein zu halten, wurden nur solche Versuche ausgewertet, bei denen sich die Gehirngewichte der Tiere um weniger als 200 mg unterschieden. Die Versuche an Mäusen wurden mit Tieren von gleichem Gewicht (23 g) durchgeführt.

In der ersten Versuchsreihe wurde das Gehirn nach der Dekapitation aus dem Schädel herauspräpariert. Hierfür benötigt man bei schnellem Arbeiten etwa 15 sec. Dann wird das Gehirn unmittelbar in 10%ige Trichloressigsäure gebracht und sehr schnell in einem gekühlten Mörser bei 0° zerrieben.

Die andere Serie wurde durch Einbringen in flüssige Luft getötet, das gefrorene Gehirn isoliert und in einem gekühlten Mörser bis zum Auftauen unter Zugabe von Trichloressigsäure zerrieben oder nach vollständiger Zerkleinerung unmittelbar in Trichloressigsäure von 0° gebracht. Bei der Aufarbeitung wurden niemals mehr als insgesamt 4,5 cm³ Trichloressigsäure zugesetzt. Im Arbeitsvorgang hielten wir uns an die Angaben von Richter u. Crossland. Bei den Versuchen mit flüssiger Luft betrug die Extraktionszeit nach Zugabe der Trichloressigsäure 20 min, bei der anderen Versuchsserie wurde 2 Std extrahiert. Diese Versuchszeiten wurden von den erwähnten Autoren für die Gewinnung optimaler Acetylcholinmengen aus den Gehirnen angegeben. Nach dem Abzentrifugieren der unlöslichen Zellbestandteile und der gefällten Proteine geschah die Auswertung der überstehenden Flüssigkeit. Unmittelbar vor der Auswertung wurden die Extrakte mit 5%iger NaOH neutralisiert und durch m/15 Phosphatpuffer auf p_H 6,8 eingestellt.

Die Identifizierung des Acetylcholins erfolgte in der üblichen Weise mit Hilfe biologischer Verfahren. Die aus dem Gehirn extrahierte Substanz ließ sich durch Kochen bei alkalischer Reaktion zerstören und durch Cholinesterase hydrolysieren. Nach vorheriger Zugabe von Atropin wurde die Wirkung am Meerschweinchendarm aufgehoben. Zur quantitativen Auswertung erwies sich der rectus abdomin. des Frosches als besonders geeignet (Chang u. Gaddum 1933). Dieser Froschmuskel reagiert ebenso spezifisch wie der Blutegel, arbeitet aber bedeutend schneller. Die Empfindlichkeit ist zwar etwa ein Zehntel geringer, reichte aber für unsere Untersuchungen aus. Die in der Extraktionsflüssigkeit enthaltenen Kaliummengen sind zu gering, um die biologische Testung zu stören.

Eine bestimmte Menge der neutralisierten Lösung wurde nach Zusatz von Eserin (1 : 50000 Endkonzentration) zu je 4 Rectuspräparaten gleichzeitig gegeben. Für die Auswertung wurden nur solche Versuche herangezogen, bei denen die Ausschläge aller 4 Präparate eine hinreichende Übereinstimmung (Abweichung weniger als 10%) zeigten. Die Funktion der Testmuskeln wurde jeweils im Vergleich mit bekannten Mengen Acetylcholin geprüft. Die unterste Grenze der Empfindlichkeit liegt beim Froschrectus zwischen 0,03 bis 0,1 γ Acetylcholinhydrochlorid in 5 cm³ Versuchslösung. Nach Feststellungen von W. Feldberg (1948) können Gehirnextrakte sensibilisierende Substanzen enthalten, die einen zu hohen Acetylcholingehalt vortäuschen. Dies wurde bei den Auswertungen berücksichtigt und mögliche Fehler durch vergleichende Untersuchungen mit alkalisch auf-

gekochten und anschließend neutralisierten Extrakten, denen bestimmte Mengen Acetylcholin zugesetzt wurden, ausgeschlossen.

Statistische Auswertungen erfolgten nach dem t-Verfahren. Bei einem Wert von $P \leq 0{,}0027$ ist die Differenz gut gesichert.

Abb. 1 gibt die erhaltenen Mengen Acetylcholin aus den Gehirnen normaler Ratten 2 verschiedener Gewichtsklassen bei Anwendung der bereits beschriebenen Methoden wieder. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die Tötung der Versuchstiere mit flüssiger Luft keinen Vorteil bietet.

Gleichzeitig haben wir den Einfluß des Elektroschockes und des Cardiazols auf den Acetylcholingehalt des Gehirns geprüft.

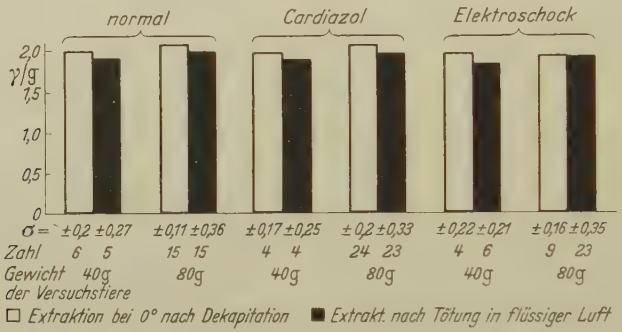


Abb. 1. Acetylcholingehalt des Gehirns.

Die Auslösung des Elektroschockes erfolgte nach dem von H. Kewitz u. H. Reinert beschriebenen Verfahren durch periodische Rechteckimpulse von 10 msec Dauer und einer Frequenz von 50 Hz. Die Reizdauer betrug 1 sec. Die zangenförmig angeordneten Elektroden wurden am harten Gaumen und in der Mitte des Schädeldaches angelegt. Bei dieser Versuchsanordnung bekamen alle Tiere mit 12 MA einen ausgeprägten tonisch-klonischen Krampf. Die Cardiazolkrämpfe wurden durch intravenöse Injektion von 40 mg kg erzielt. Die Tiere wurden auf dem Höhepunkt des generalisierten Krampfanfalles getötet.

Eine Verminderung des Acetylcholingehaltes im Gehirn während der Krämpfe konnte in keinem Fall festgestellt werden. Wir haben diese Ergebnisse noch durch Versuche an älteren Tieren erweitert, die nicht durch flüssige Luft getötet wurden.

Es war überraschend, daß die Werte auch bei den Scillirosidkrämpfen durchaus den normalen entsprachen, obwohl die durch das Gift (0,4 mg/kg) hervorgerufenen Erregungszustände zum Teil 24 Std und länger anhalten.

Die Vergiftung ist vor kurzem eingehend von E. Rothlin u. W. Schalch beschrieben worden und verläuft mit tonisch-klonischen Krampfanfällen, kombiniert mit Streckkrämpfen und Drehbewegungen des Körpers um die Längsachse (Rollkrämpfe). Während der Krampfintervalle, die etwa 5—10 min dauern, tritt

nach vorübergehender Erschöpfung sehr schnell wieder eine Erregbarkeitssteigerung auf, so daß geringgradige mechanische oder akustische Reize erneut Krämpfe auslösen.

Diese Versuche lieferten also keinerlei Anhaltspunkte dafür, daß Acetylcholin im Krampfanfall mehr in Anspruch genommen wird als bei normaler Funktion des Gehirns. Die Ansicht von Richter u. Crossland, daß die Krämpfe durch Acetylcholinmangel zum Stillstand kommen, ist sicher nicht richtig. Hier könnte vielleicht der Einwand gemacht werden, daß die erwähnten Autoren ihre Befunde an sehr kleinen Ratten von 20—30 g Gewicht erhoben haben, während unsere kleinsten

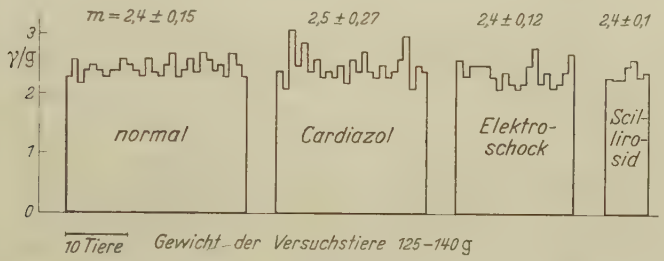


Abb. 2. Acetylcholingehalt des Gehirns im Normalzustand und bei generalisierten Krämpfen.

Tiere 40 g wogen. Es erscheint uns wenig überzeugend, wenn ein Vorgang, dem eine erhebliche physiologische Bedeutung zukommen soll, ausschließlich bei Tieren in einem Alter von wenigen Tagen nachgewiesen werden kann.

Es gibt aber Funktionsänderungen des Gehirns, bei denen Abweichungen vom normalen Acetylcholingehalt nachweisbar sind. Das ist z. B. bei der Narkose der Fall. Hier stimmen unsere Versuchsergebnisse mit denen von W. Feldberg sowie D. Richter u. J. Crossland überein. Denn die Narkose führt zu einem erheblichen Anstieg von Acetylcholin im Gehirn. Der Grad der Vermehrung ist abhängig von der Konzentration des Narkosemittels und der damit verbundenen Tiefe der Narkose. Dies muß bei der Bewertung solcher Versuche berücksichtigt werden.

Diese Erhöhung der Acetylcholinkonzentration im Gehirn spricht dafür, daß bei der normalen Funktion des Gehirns laufend Acetylcholin verbraucht wird. Wenn dies der Fall ist, so müssen sich auch nach Injektion von Cholinesterasegiften (O. Loewi u. E. Navratil) Vermehrungen des Acetylcholingehaltes im Gehirn der Versuchstiere nachweisen lassen, da unter diesen Bedingungen das Gleichgewicht zwischen Synthese und Verbrauch des Acetylcholins gestört wird. Bei der bisher benutzten Versuchsanordnung muß man sich darüber im klaren sein, daß hierbei sehr wahrscheinlich nur die inaktive Depotform erfaßt wird, aus

der nach allgemein geltender Ansicht das Acetylcholin im Bedarfsfall freigesetzt wird. Intravenöse Injektion einer hohen Dosis von 3 mg/kg Eserin führt zu einem ganz erheblichen Anstieg des Acetylcholins im Gehirn. Eine ähnliche Beobachtung ist mit etwas anderer Versuchsanordnung von K. A. C. Elliot u. N. Henderson gemacht worden.

Die Erhöhung der Acetylcholinkonzentration im Gehirn bei der Narkose muß aber auf eine andere Ursache zurückgeführt werden, denn nach intravenöser Injektion von Cardiazol erhält man an narkotisierten Tieren auf Grund der Weckwirkung dieser Substanz sofort wieder normale Werte. Vorbehandlung mit Eserin läßt dagegen die Acetylcholinwerte nach Cardiazolinjektion unbeeinflußt. Es war interessant, daß es bei diesen Tieren noch zum Auftreten von tonischen Krämpfen kam. Auch diese Versuche sprechen dagegen, daß Acetylcholin für die Genese generalisierter Krämpfe ursächlich wichtig ist.

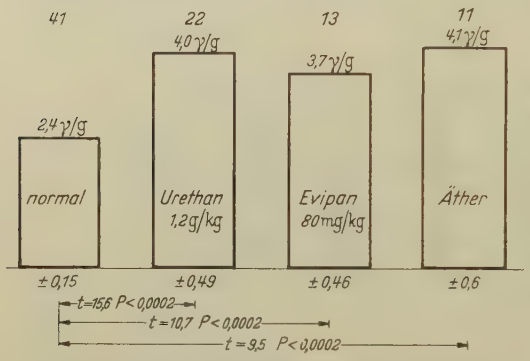


Abb. 3. Acetylcholingehalt des Gehirns bei verschiedenen Narkosen. Gewicht der Versuchstiere 125 g. (Die Zahlen über den Kolumnen geben die Anzahl der Versuche an.)

Es schien uns wesentlich, die nach intravenöser Injektion von Eserin erhobenen Befunde durch einen Vergleich mit der Wirkung von Prostigmin zu erweitern, das nach Untersuchungen von Bülbring u. Burn die Reflextätigkeit von Rückenmarkpräparaten in der gleichen Weise beeinflußt wie Physostigmin. Prostigmin führte gegenüber Eserin nur eine sehr geringe Erhöhung der Acetylcholinwerte des Gehirns herbei.

Zur Erklärung der Unterschiede der Wirkungsweise dieser beiden Cholinesterasegifte ist schon häufig ihre verschiedene Konstitution herangezogen worden. Physostigmin ist lipoidlöslich und kann somit in die Zellen eindringen, Prostigmin als quaternäre Ammoniumbase wird dagegen nur an den Oberflächen der Zellen reagieren. Dies erklärt wahrscheinlich auch die Unterschiede, die wir bei der Testung des Acetylcholingehaltes im Gehirn gefunden haben, dessen höhere Werte nach Physostigmin-Injektion als intracelluläre Stabilisation des Acetylcholins gedeutet werden müssen.

Diese Befunde interessierten uns noch aus einem anderen Grunde. In früheren Versuchen hatten wir nämlich gefunden, daß die Hexachlorcyclohexane bestimmte Wirkungen einiger Cholinesterasegifte beeinträchtigen oder aufheben können (Coper, Herken u. Klempau, 1951).

Tabelle 1. *Acetylcholingehalt des Gehirns in γ/g nach Einwirkung verschied. Pharmaka.*

(Gewicht der Versuchstiere 125—140 g.)
(Auswertung nach dem *t*-Verfahren.)

normal	Eserin 3 mg/kg	Eserin + Cardiazol 100 mg/kg	Urethan 1,2—1,3 g/kg	Urethan + Cardiazol 100 mg/kg	Prostigmin 1 mg/kg
2,3	5,3		3,5		2,5
2,6	5,0		4,2		2,8
2,2		4,8		2,3	
2,4	5,4		5,0		2,2
2,5	4,8	4,9	4,0	2,4	2,2
2,4					
2,3	4,8	5,3	4,2	2,5	2,7
2,4					
2,4	5,2	4,7	3,7	2,3	2,6
2,6	5,5		3,4		2,4
2,5	4,6	5,0	3,2	2,6	3,1
2,4					
2,3	5,5	5,4	4,3	2,3	3,0
2,6					
2,4	4,7	4,9	4,4	2,3	2,9
2,3	5,3		4,7		2,3
2,5	5,7		4,5	2,5	2,6
2,7					
2,3	4,8		4,7		2,3
2,4	5,0		3,5		3,3
2,6					
2,4	4,7		3,8		2,7
2,7	5,0		3,9		3,1
2,6					
2,4	5,2		4,0		2,1
2,1	5,2		3,4		3,0
2,5					
2,3	5,5		3,5		2,3
2,7	5,6		4,0		
2,5					
2,3	5,7		4,5		
2,4	5,5		4,0		
2,5					
2,7	5,4				
2,4	5,6				
2,5					
2,3					
2,4					
2,6					
2,4					
2,6					
$M \pm \sigma$ 2,4 ± 0,15	5,2 ± 0,35	5,0 ± 0,26	4,0 ± 0,49	2,4 ± 0,11	2,7 ± 0,36

$t = 37{,}8 \quad P = < 0{,}0002$

$t = 15{,}5 \quad P = < 0{,}0002$

$t = 3{,}5 \quad P = < 0{,}001$

Physostigmin und Prostigmin erzeugen bekanntlich nach Injektion höherer Dosen charakteristische fibrilläre und fasciculäre Zukkungen, die sich über die gesamte Muskulatur der Versuchstiere ausbreiten. Nach Vorbehandlung mit dem α-Hexachlorcyclohexan gelang es, diese Wirkungen des Prostigmins bei mehr als 50% der Tiere aufzuheben. Beim Eserin war dies nicht möglich. Diese Versuche schienen uns zur Differenzierung zentraler Wirkungen verschiedener Cholinesterasegifte geeignet, die durch Hinzunahme der Acetylcholinanalysen des Gehirns erweitert und gesichert werden sollten. Die starke Vermehrung des Acetylcholins im Gehirn blieb auch bei den mit Hexachlorcyklohexan vorbehandelten Versuchstieren nach Physostigmin-Injektion unverändert. Es schien daher nicht ausgeschlossen, daß diese einseitige Störung des Gleichgewichts zwischen Synthese und Verbrauch des Acetylcholins im Gehirn und die sich daraus ergebende Vermehrung des freien Wirkstoffs die hemmende Wirkung der Hexachlorcyclohexane auf die fibrillären und fasciculären Zuckungen der Muskulatur verhindert. In dieser Ansicht wurden wir duch Versuche mit dem p-Nitrophenyldiäthylphosphat bestärkt, das von G. Schrader synthetisiert und von W. Wirth in seinem Wirkungsmechanismus als starkes Cholinesterasegift beschrieben wurde.

Nach subcutaner Injektion von 0,9 mg/kg p-Nitrophenyldiäthylphosphat (Mintacol) wird ein typisches Vergiftungsbild mit fibrillären Muskelzuckungen, Beschleunigung der Atmung mit Atemnot und tonisch-klonischen Krämpfen beobachtet. Der Tod der Tiere tritt im akuten Krampfanfall unter den Zeichen schwerer Atemnot ein.

Wir fanden, daß p-Nitrophenyldiäthylphosphat ebenso wie Eserin eine Erhöhung des Acetylcholingehaltes im Gehirn vom Warmblüter erzeugt. Nach einmaliger Vorbehandlung mit dem α-Isomeren des Hexachlorcyclohexans ist diese Acetylcholinvermehrung viel geringer. Bei den als resistent bezeichneten Tieren erreichen die Befunde fast die Normalwerte. Hier blieben auch die eben beschriebenen Vergiftungssymptome völlig aus, obwohl die injizierte Dosis von 0,9 mg/kg für den größten Teil der Kontrolltiere tödlich ist.

Diese Versuche wurden an Mäusen vorgenommen, weil sich der antagonistische Effekt der Hexachlorcyclohexane gegenüber Mintacol an diesem Versuchstier besonders gut demonstrieren läßt. Die Herabsetzung der Toxizität dieser Substanz für Mäuse durch die Vorbehandlung mit den chlorierten Kohlenwasserstoffen ist in der nächsten Tabelle gleichen Versuchen mit Eserin gegenübergestellt. Der Abstand zwischen der letzten Hexachlorcyclohexangabe und der Applikation des Cholinesterasegiftes betrug 4 Tage.

Bei seinen Versuchen hat W. Wirth darauf aufmerksam gemacht, daß keine wesentlichen Unterschiede im Wirkungsmechanismus der

Cholinesterasegifte Physostigmin und p-Nitrophenyldiäthylphosphat mit der gebräuchlichen pharmakologischen Methodik festzustellen waren. Auch die Vergiftungsbilder an der Maus wiesen große Ähnlichkeiten auf. Durch die Acetylcholinanalysen des Gehirns und durch die Vorbehandlung der Versuchstiere mit Hexachlorcyclohexan wird eine interessante

Tabelle 2. *Versuche mit Eserin und Mintacol an Mäusen (23 g). Acetylcholingehalt des Gehirns in γ/g.*

Nicht vorbehandelt			Mit α-HCH vorbehandelt		
			Mintacol		
normal	Mintacol 0,9 mg/kg	Eserin 0,5 mg/kg	resistent	nicht vollk. resistent	Eserin
1	2	3	4	5	6
2,3	3,5	3,1	2,4	3,0	3,0
2,2	3,5	3,0	2,7	3,1	3,3
2,2	3,4	3,3	2,5	2,9	3,1
2,1	3,6	2,9	2,5	3,2	3,2
2,2	3,4	3,2	2,6	2,9	
2,3	3,2		2,4	3,0	
1,9	3,5		2,5	2,8	
			2,7	2,9	
$M \pm \sigma$ *2,2* ± 0,14	*3,4* ± 0,15	*3,1* ± 0,16	*2,5* ± 0,13	*3,0* ± 0,13	*3,2* ± 0,14

Statistische Auswertung nach dem *t*-Verfahren.

Spalte 1:2; $t = 15{,}8$; $P = < 0{,}0002$
1:3; $t = 10{,}2$; $P = < 0{,}0002$
1:4; $t = 4{,}3$; $P = < 0{,}0015$
1:5; $t = 11{,}4$; $P = < 0{,}0002$

Spalte 2:4; $t = 12{,}3$; $P = < 0{,}0002$
2:5; $t = 8{,}2$; $P = < 0{,}0002$
3:6; $t = 1{,}0$; $P = > 0{,}2$

Tabelle 3. *Versuche mit Mintacol und Eserin an Mäusen.*
(Letzte Dosis Hexachlorcyclohexan — HCH — stets *4 Tage vor* Mintacol od. Eserin.)

Art und Menge der HCH-Gabe i. p.	Erregendes Pharmakon	Zahl der Versuchstiere	Zahl der Tiere mit Krämpfen	Todesfälle nach Appl. des erregenden Pharmakons
—	Mintacol 0,9 mg/kg s.c.	22	18	18
300 mg/kg α-HCH	Mintacol 0,9 mg/kg s.c.	12	0	0
200 mg/kg β-HCH nach 4 Tagen 280 mg/kg α-HCH	Mintacol 0,9 mg/kg s.c.	9	0	0
—	Eserin 0,5 mg/kg s.c.	7	7	2
200 mg/kg β-HCH nach 4 Tagen 280 mg/kg α-HCH	Eserin 0,5 mg/kg s.c.	9	9	5

Unterscheidung der cerebralen Wirkungen dieser Cholinesterasegifte erreicht, die bisher nicht bekannt war. W. Feldberg (1950) hat verschiedene Argumente dafür angeführt, daß Eserin in bestimmten Dosen nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Acetylcholin biologische Wirkungen erkennen läßt. Diese Ergebnisse reichen aber nicht aus, um die Unterschiede in den Wirkungen der Cholinesterasegifte auf den zentralen Acetylcholinstoffwechsel zu erklären, der auf Grund der Befunde mit Hexachlorcyclohexan nicht gleich sein kann.

Ein Teil der nach Einwirkung von Physostigmin und p-Nitrophenyldiäthylphosphat beobachteten Vergiftungssymptome ist sicher peripheren Ursprungs. Die Atemnot, die als Folge der Bronchoconstriction auftritt und in vielen Fällen als unmittelbare Todesursache angesehen werden kann, wird von W. Wirth wohl mit Recht als periphere Wirkung gedeutet. Dies gilt sehr wahrscheinlich auch für die fibrillären und fasciculären Zuckungen der Muskulatur, die einige Tage nach Durchschneiden des den Muskel versorgenden Nerven ausbleiben, nachdem die Nervenfasern ihr Acetylcholin verloren haben und neue Überträgersubstanz nicht mehr synthetisiert werden kann (W. Feldberg, 1950).

Unsere bisherigen Versuche haben ergeben, daß der Angriffspunkt der Hexachlorcyclohexane in supratentorial gelegenen Abschnitten des Vorderhirns zu suchen ist (Herken, Monnier, Coper u. Laue, 1952). Die krampfhindernden Wirkungen wurden durch Decerebrierung beseitigt. Ebenso konnte an Rückenmark-Reflexpräparaten bei Tieren, die mit Hexachlorcyclohexan vorbehandelt waren, keinerlei Änderung der Reflextätigkeit nachgewiesen werden (H. Herken, H. Kewitz u. I. Klempau, 1952). Die Verminderung der Toxizität des Mintacols und des Prostigmins durch die Hexachlorcyclohexane ist daher auch nicht durch einen atropinähnlichen Wirkungsmechanismus zu erklären, zumal die Toxizität des Carbaminoylcholins (Doryl) ebensowenig wie die des Physostigmins durch die chlorierten Kohlenwasseerstoffe beeinflußt wird. Ganz abgesehen davon, daß sich die Hexachlorcyclohexane auch noch durch die ungewöhnliche Dauer ihrer Wirkung vom Atropin unterscheiden. Das Ausbleiben jeglicher Vergiftungssymptome nach Injektion tödlicher Dosen des p-Nitrophenyldiäthylphosphats bei den vorbehandelten Tieren läßt daher die besondere Bedeutung des cerebralen Acetylcholinstoffwechsels für das Zustandekommen vegetativer und motorischer Regulationen erkennen. Mit Hilfe der Hexachlorcyclohexane lassen sich neue Wege für das Studium zentraler Wirkungen cholinergischer Pharmaka erschließen, die für das Zustandekommen physiologischer Reaktionen des peripheren Nervensystems wichtig sind.

Zusammenfassung.

Bei der Bestimmung von Acetylcholin im Gehirn von Ratten bietet die Tötung der Versuchstiere mit flüssiger Luft keinen Vorteil gegenüber den älteren Verfahren, bei denen das Gehirn nicht gefroren wird.

Ein Absinken der Acetylcholinwerte des Gehirns konnte weder im Elektroschock noch bei Cardiazolkrämpfen beobachtet werden. Der Acetylcholingehalt des Gehirns wird auch bei den lang anhaltenden Scillirosidkrämpfen außerordentlich konstant gehalten.

In der Narkose ist der Acetylcholingehalt stark erhöht. Der gleiche Befund wird nach intravenöser Injektion von Eserin erhoben. Beide Vorgänge haben einen verschiedenen Wirkungsmechanismus. Durch Cardiazolinjektionen läßt sich der cerebrale Acetylcholingehalt nur bei den narkotisierten Tieren normalisieren. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß bei der normalen Gehirnfunktion laufend Acetylcholin verbraucht wird. Prostigmin erzeugt nur eine geringe Erhöhung der Acetylcholinwerte des Gehirns.

p-Nitrophenyldiäthylphosphat erhöht den Acetylcholingehalt des Gehirns in gleichem Ausmaß wie Eserin. Durch Vorbehandlung mit einigen Hexachlorcyclohexanen lassen sich die nach Verabreichung von p-Nitrophenyldiäthylphosphat auftretenden Vergiftungssymptome bei dem größten Teil der Versuchstiere (Mäuse) völlig beseitigen. Auch die Acetylcholinwerte des Gehirns werden dadurch beeinflußt. Die gleiche Vorbehandlung hat keine Wirkung auf die Vergiftung mit Eserin; der zentrale Wirkungsmechanismus beider Cholinesterasegifte muß verschieden sein.

Die vergleichenden Versuche mit Eserin und Mintacol an normalen und vorbehandelten Versuchstieren stellen die besondere Bedeutung heraus, die der cerebrale Acetylcholinstoffwechsel für das Zustandekommen vegetativer und motorischer Regulationen hat.

Für die Überlassung des Scillirosid danken wir Herrn Prof. Dr. E. Rothlin für das p-Nitrophenyldiäthylphosphat Herrn Prof. Dr. W. Wirth.

Literatur.

Bülbring, E., J. H. Burn: J. of Physiol. **100**, 337 (1941). — Chang und Gaddum, J. H.: J. Physiol. **79**, 255 (1933). — Coper, H., H. Herken u. I. Klempau: Naturwiss. **1951**, 69. — Crossland, J.: J. of Physiol. **114**, 318 (1951). — Elliot, K. A. C., u. N. Henderson: Amer. J. Physiol. **165**, 365 (1951). — Feldberg, W.: J. of Physiol. **107**, 372 (1948) Brit. Med. Bull. **6**, 312 (1950). — Herken, H., H. Kewitz u. I. Klempau: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 217 (1952). — Herken, H., M. Monnier, H. Coper, H. Laue: Experientia VIII, 432 (1952). — Kewitz, H., u. H. Reinert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 93 (1952). — Loewi, O.: Pflügers Arch. **189**, 239 (1921). — Loewi, O., u. E. Navratil: Pflügers Arch. **214**, 689 (1926). — Opitz, E.: 3. Colloquium, Ges. physiol. Chemie, Springer-Verl. 1952, S. 87. — Richter, D., u. J. Crossland: Amer. J. Physiol. **159**, 247 (1949). — Rothenberg, M. A., u. D. Nachmansohn: J. of Biol. Chem. **168**, 223 (1947). — Rothlin, E., u. W. R. Schalch: Helvet. physiol. Acta **10**, 427 (1952). — Wirth, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 547 (1949).

Prof. Dr. Hans Herken, Pharmakol. Institut der Freien Universität Berlin.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 234—241 (1953).

Aus der Physiologischen Abteilung des Paracelsus-Institutes Bad Hall
(Vorstand: Prof. Dr. F. v. Brücke, Universität Wien).

Zur Charakterisierung der Erregungssubstanz sensibler Nerven*.

Von

H. Hellauer.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. März 1953.)

Nachdem Loewi die Aktionssubstanz eines bestimmten Nerven gefaßt hatte, lag es nahe, die Aktionssubstanzen der anderen Nerven zu suchen. Acetylcholin und (Nor-) Adrenalin wurden als Aktionssubstanz einer Vielzahl von Nerven erkannt. Es war aber nicht gelungen, auch den sensiblen Nerven einen dieser beiden Stoffe oder einen anderen bekannten Stoff, etwa Histamin, als Aktionssubstanz zuzuordnen. 1926 hatten Lewis u. Marvin bei der antidromen Gefäßerweiterung eine chemische Übertragung nachzuweisen versucht. Nimmt man mit Dale an, daß sensible Neurone in der Peripherie und im Zentrum dieselbe Aktionssubstanz freisetzen, so kommt dem Nachweis einer peripher im Axonreflex ausgeschiedenen Aktionssubstanz erhöhte Bedeutung zu.

In gemeinsamen Arbeiten mit Umrath war es gelungen, aus dorsalen Rückenmarkswurzeln einen Extrakt mit folgenden Eigenschaften zu gewinnen: Er wirkt wie antidrome Nervenerregung am Kaninchenohr nach subcutaner Injektion capillarerweiternd (Hellauer u. Umrath, 1947). Die Spezifität des Testes wird durch sensible Denervierung erhöht: gleich hergestellte Extrakte ventraler Wurzeln zeigen sich jetzt gegenüber dem Extrakt der dorsalen Wurzeln besonders schwach wirksam (Hellauer u. Umrath, 1948, Häusler u. Hellauer, 1950). Die Wirksamkeit wird durch ein im Nervensystem enthaltenes Ferment vernichtet (Umrath u. Hellauer). Krampfgifte hemmen das Ferment in dem gleichen Verhältnis, in dem sie Krämpfe erzeugen (Hellauer u. Umrath, 1949, Umrath, 1953). Florey fand, daß Bienenaugen auf eingebrachten dorsalen Extrakt so reagieren, wie wenn sie belichtet würden, auf eingebrachten ventralen Extrakt und auf A.Ch. so, wie wenn sie verdunkelt würden; Krampfgifte wirken im Sinne einer Potenzierung der Belichtung, im Dunklen wirken sie nicht. Ferment beseitigt in den Extrakten diese Effekte ebenfalls.

Zweck der folgenden Untersuchung ist, durch chemische Charakterisierung der Substanz eine allgemeinere Vergleichsbasis zu schaffen.

Extraktionsmethode. Die Extrakte wurden, wie bereits früher beschrieben (Hellauer u. Umrath, 1948), durch Aufkochen von 1—2 g Rückenmarkswurzeln von Rindern in der dreifachen Menge 0,65% Kochsalzlösung, die zusätzlich 0,01% $CaCl_2$ enthielt, bereitet. Nachfolgendes scharfes Zentrifugieren ergibt eine fast klare

* Herrn Hofrat Prof. Dr. Otto Loewi in Dankbarkeit zum 80. Geburtstag.

Lösung, im weiteren einfach Kochextrakt genannt. D bezeichnet den Extrakt der dorsalen Nervenwurzeln, V den der ventralen Wurzeln. Wenige Minuten nach Tötung der Tiere wurde das Gewebe aus dem Duralsack entnommen und im Schlachthaus noch zu den Extrakten verarbeitet, die frisch am Kaninchenohr und am isolierten Meerschweinchendarm getestet wurden.

I. Testung am entnervten Kaninchenohr.

1—3 Wochen nach Ausschneiden eines Stückes N. auric. magn. wurden subcutan an korrespondierenden Stellen des li. und des re. äußeren Ohres 4 oder 6mal 0,15 ml zweier Vergleichslösungen paarweise mit Seitenwechsel injiziert und 20 min später die Rötungsunterschiede abgelesen. Endgültig bewertet wurde das regelmäßige Auftreten oder Fehlen eines Rötungsunterschiedes in einer großen Serie identischer Versuche. Quantitative Aussagen beruhen auf Feststellung von Wirkungsgleichheit bei Testung einer Verdünnungsreihe.

Wirksamkeit dorsaler und ventraler Wurzeln. Wie Loewi in einer Arbeit mit mir erstmalig feststellte, ist A. Ch. in größeren Mengen aus den ventralen, nicht aber aus den dorsalen Wurzeln zu gewinnen (Loewi u. Hellauer, 1938, Hellauer, 1939). Dementsprechend vermutete ich, daß die sensiblen Nerven eine andere Aktionssubstanz bevorzugt enthalten.

In den gemeinsamen Versuchen mit Umrath, eine Testmethode für die Aktionssubstanz der sensiblen Nerven zu finden, war dieser Gedanke insofern führend, als vom Test verlangt wurde, daß der Extrakt der dorsalen Wurzeln wesentlich stärker als der in gleicher Weise hergestellte Extrakt der ventralen Wurzeln anspricht. Nach Mißerfolgen mit Strychnin-sensibilisierten Rückenmarkspräparaten weniger Segmente wie sie ähnlich Lueken verwendete, schlug Umrath im Hinblick auf den Mechanismus des Axonreflexes vor, die capillarerweiternde Wirkung der Extrakte durch subcutane Injektion in das äußere Ohr des Kaninchens zu prüfen. Nach Entnervung wurden die Rötungsunterschiede der beiden Extrakte um vieles deutlicher, so daß jetzt für die weiteren Versuche ein brauchbarer Test vorhanden war (Hellauer u. Umrath, Häusler u. Hellauer).

Im Verlauf der verschiedenartigen, noch mitzuteilenden Versuche wurden 65mal die D- und V-Extrakte an entnervten Kaninchenohren miteinander verglichen und 63mal D wirksamer gefunden als V.

Empfindlichkeit gegen Oxydation und Reduktion. Durchperlt man 15 min lang Extrakt D mit ozonhaltigem Sauerstoff, so nimmt die rötende Kraft des Extraktes ab: 9 Versuche. Schickt man durch Extrakt D Wasserstoff, mit Platinmoor in der Lösung aktiviert, so ändert sich die Wirkung des Extraktes nicht, oder nimmt sogar schwach zu: 2 Versuche. Läßt man aktivierten Wasserstoff auf ozonbehandelte, in ihrem rötenden Effekt stark abgeschwächte Extrakte einwirken, so zeigt der Vergleich mit den einfach ozonbehandelten Extrakten und mit den unbehandelten Ausgangsextrakten die Wiederherstellung der ursprünglich vorhandenen rötenden Kraft oder sogar ihre leichte Verstärkung: 4 Versuche.

Stabilität gegen Säure und Alkali. Um festzustellen, ob das kurze Aufkochen bei der Extraktion einen Wirksamkeitsverlust bedingt, wurde

die Hitzeempfindlichkeit der fertigen Extrakte geprüft. Eine Probe kurz aufgekocht war in den 3 entsprechenden Testungen gleich wirksam wie der unbehandelte Rest. Läßt man aber 95° 12 Std lang einwirken, so nimmt die rötende Kraft der Probe stark oder vollständig ab, wie 4 Vergleichsbestimmungen mit dem kühlgehaltenen Stammextrakt ergaben. Versetzt man den Extrakt im Verhältnis 1:30 mit 0,1 n-HCl, so ist — neutralisiert getestet — keine Abnahme mehr festzustellen: 3 Versuche. Versetzt man den Extrakt im Verhältnis 1:30 mit 0,1 n-NaOH, so ist — neutralisiert getestet — die Abnahme gleich groß wie bei den Proben ohne Zusatz: 6 Versuche. Im alkalischen Bereich aber beseitigt auch schon kurzes Erhitzen die Wirksamkeit. Je 2 ml wurden in gleichen Gläsern aus Mikrobüretten nach Gorbach mit 50 μl 0,1 n-NaOH versetzt, so daß sich der p_H-Wert — mit Glaselektroden bestimmt — von 6,7 auf 10,05 änderte, wobei eine Abnahme der Wirksamkeit auf 1:4 erfolgte. Bei doppeltem Zusatz NaOH und einem p_H von 11,05 ergab sich eine Abnahme auf 1:16 (jeweils 6 Versuche). Ohne jede Abnahme blieben unter diesen Bedingungen Lösungen, die mit einer entsprechenden Menge HCl versetzt waren: 4 Versuche. Gleiche Verhältnisse zeigten ultrafiltrierte, nach Abschnitt 8 hergestellte Extrakte, wobei analoge p_H-Änderungen halb so große Zusätze erfordern. Mit steigender Alkalität zwischen p_H 10,1 und 11,5 erhält man bei 3 min 100° schwache bis vollständige Abnahmen: 8 Versuche. Gegenüber dem bei p_H 11,5 behandeltem D ist V wirksamer, es wird aber ebenso unwirksam wie D nach gleicher alkalischer Behandlung. Stellt man das A. Ch. in V (Egeltest) der rötungswirksamen Substanz in D (Ohrtest) gegenüber, so nimmt, gleich behandelt, bei p_H 10,05 das A. Ch. auf 1:32, die rötungswirksame Substanz auf 1:4 ab und bei p_H 11,05 das A. Ch. auf 1:300, die rötungswirksame Substanz auf 1:16.

Während die nativen Extrakte das Trocknen durch Eindampfen bei 100° nicht vertragen (3 Versuche), bleibt nach Zusatz von n-Essigsäure im Verhältnis 1:30 die Wirksamkeit von D wie der Unterschied D zu V voll erhalten: 19 Versuche. Mit HCl angesäuerte Extrakte verlieren beim Eindampfen ihre Wirksamkeit: 5 von 7 Versuchen. Bei Zimmertemperatur und Unterdruck ist ein verlustloses Eintrocknen auch ohne Zusatz möglich: 8 Versuche.

Löslichkeit in Alkohol. Getrocknete Extrakte behalten nach Verreiben mit wasserfreiem Äthanol und Abtrennen der alkoholischen Lösung ihre DV-Unterschiede (16 Versuche). 0,01 n-salzsaure Kochextrakte, oftmals auf etwa 5% eingeengt und zwischendurch immer wieder mit absolutem Alkohol aufgefüllt, geben die Wirksubstanz an den Alkohol ab (6 Versuche). Direktes Zerreiben der Wurzeln in 96%igem Alkohol erzeugt stark rötende Extrakte bei verminderten DV-Unterschieden (4 Versuche), was auf zusätzliches Mitextrahieren rötender Begleitstoffe hinweist. Die

Begleitstoffe lassen sich mit Äther entfernen, V verliert so seine Wirksamkeit, D jedoch nicht (2 Versuche).

Daß rötungssteigernde, alkohollösliche Begleitstoffe in geringer Menge auch schon in den Kochextrakten D und V vorhanden sind, zeigten übereinstimmend 14 Testungen von Extraktgemischen (zu je gleichen Teilen) aus wäßrigen Auszügen des alkoholischen Rückstandes D mit jenen des eingetrockneten alkoholischen Zentrifugates D und V, wobei sich im Gehalt dieser Substanzen D und V nicht unterschieden.

Löslichkeit bei Eiweißfällung mit dialysierter Eisenoxydlösung. Wird in einem Kochextrakt das Eiweiß mit 5%iger, dialysierter Eisenoxydlösung gefällt, so erhält man wirksame, eiweißfreie Extrakte mit hohen DV-Differenzen: 7 Versuche. V rötet dann nicht stärker als Ringer-Lösung: 5 Bestimmungen. Auf die gleiche, minimale Wirksamkeit kommt D nach kurzem Erhitzen mit Alkali: 4 Versuche. Die Wirksamkeit von V wird durch alkalisches Kochen nicht mehr geändert: 2 Versuche. Gegenüber dem unbehandelten D zeigte sich das enteiweißte D in 4 Versuchen gleich, in 8 Versuchen schwächer wirksam. Gegenüber dem unbehandelten V war das enteiweißte V in allen Versuchen schwächer wirksam. Beides zusammen weist darauf hin, daß Begleitsubstanzen mitgefällt worden sind oder aber daß die Wirkungssubstanz selbst am Niederschlag zum Teil absorbiert worden ist.

Adsorbierbarkeit. Aus Extrakt D konnte die Wirksubstanz an nach Brockmann standardisiertem Aluminiumoxyd (17 Versuche), an Aktivkohle (3 Versuche) und an Silikagel Ee und Em der Fa. Gebrüder Hermann, Köln-Ehrenfeld (4 Versuche) adsorbiert werden. Präparat Em zeigte sich dabei um vieles stärker adsorbierend als Ee. In einem Parallelversuch mit Extrakt V, nahm A. Ch. am eserinisierten Egel getestet bei Präparat Ee auf 1:9, bei Präparat Em auf 1:100 ab.

Ultrafiltrierbarkeit. In 12 Versuchen konnte bereits festgestellt werden, daß die Substanz durch Cellophan und definierte Membranen mit 4 Benzolringen entsprechender Porenweite dialysiert. Mit dem Thiessen-Glasapparat bei 4 Atü über eiweißdichtgeprüfte Ultrafeinfilter, Sartorius-Werke, Göttingen, gewonnene Ultrafiltrate D waren in 10 Versuchen den Stammextrakten D wirkungsgleich. Ultrafiltriertes V im Egeltest auf A. Ch. untersucht zeigte gegenüber dem Stammextrakt Abnahmen zwischen 10 und 20%, Differenzen, die im Ohrtest noch nicht erfaßbar sind. Ultrafiltrat D war immer wirksamer als die auf das doppelte verdünnte Stammlösung.

II. Wirkung an Meerschweinchendarm-Präparaten, verglichen mit der Capillarerweiterung am Kaninchenohr.

Extrakt D und V. Die 1950 von Umrath u. Hellauer versuchten Testungen der Extrakte der dorsalen und ventralen Rückenmarkswurzeln am isolierten Duodenum, Jejunum und Ileum des Meerschweinchens zeigten nach Ausschaltung der

A.Ch.- und Histaminempfindlichkeit teils ein gleiches, teils ein nach dieser oder jener Richtung verschiedenes Verhältnis der D- und V-Wirkungen zueinander. Wegen der Schwankungen und einer wesentlich größeren Alkaliresistenz der Darmeffekte als der Capillareffekte schied diese Testart vorerst aus. Nachdem es nun Lembeck gelungen ist, im isolierten, knapp vor der Einmündung in das Coecum gelegenen Stück Ileum ein Präparat zu finden, das fast ausschließlich auf den Extrakt der dorsalen Wurzeln anspricht, wurde die Frage der Anwendbarkeit des Darmtestes wieder aktuell.

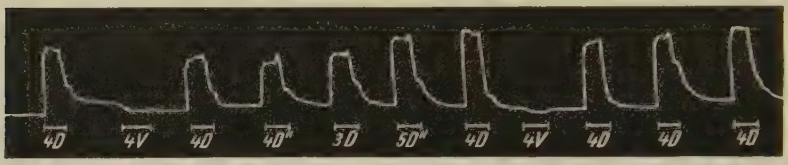


Abb. 1. Versuch vom 17. 1. 1953. Isoliertes, knapp vor der Einmündung in das Coecum gelegenes Stück Meerschweinchen-Ileum in 2 ml Tyrodelösung mit Atropin $1:10^6$ und Neoantergen $1:10^6$ bei 39° suspendiert. Kontraktionen: Ausschläge nach oben. 3 D, Zusatz von 0,3 ml Kochextrakt der dorsalen Rückenmarkswurzeln, entspricht etwa 4 D″, Zusatz von 0,4 ml bei p_H 11,05 durch 3 min langes Erhitzen auf 100° behandeltes Kochextrakt der dorsalen Rückenmarkswurzeln. 4 V, Zusatz von 0,4 ml Kochextrakt der ventralen Rückenmarkswurzeln, ist hier vollständig unwirksam.

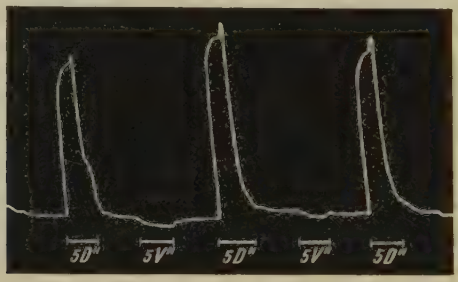


Abb. 2. Fortsetzung des Versuches vom 17. 1. 1953, spätere Testung. Trotz 3 min langem Erhitzen auf 100° bleibt der Kochextrakt der ventralen Wurzeln unwirksam. Vergleich der Zusätze von 0,5 ml des behandelten Kochextraktes der ventralen Wurzeln mit 0,5 ml des behandelten Kochextraktes der dorsalen Wurzeln.

Erhitzt man Extrakt D im kochenden Wasserbad 3 min bei p_H 11,05 und neutralisiert sofort wieder, so verliert ein und derselbe Extrakt die Capillarwirksamkeit am Ohr weitgehend — Abnahme der Wirksubstanz auf weniger als 10% — behält aber die Darmwirksamkeit zu etwa 75%: Abb. 1. In den entsprechenden 5 Versuchen nahm die darmwirksame Komponente bei p_H 10,8 nicht, bei p_H 11,05 auf 75% und bei p_H 11,2 auf 50% ab. Abb. 2 zeigt weiter, daß durch Erhitzen mit Alkali D wirksam, V aber gleichzeitig unwirksam bleibt. Demnach ist auszuschließen, daß infolge Erhitzens bei p_H 11,05 aus Begleitstoffen der Extrakte neue, einen Verlust in D ev. kompensierende Faktoren entstehen. Man muß also notwendigerweise 2 getrennte Wirkungssubstanzen im Extrakt D annehmen,

eine capillarerweiternde und eine darmkontrahierende. Zu dieser Annahme zwingt auch ein von Umrath erhobener Befund, den ich mit seiner Erlaubnis nachstehend wiedergebe. Durch Zerreiben von Nervengewebe in physiologischer Salzlösung hergestellte, nicht erhitzte Extrakte gewinnen bei 33° nach 15 Std die Fähigkeit, bei einer Endverdünnung 1:1000 die Darmwirksamkeit in 2 min um mehr als die Hälfte zu reduzieren ohne die Capillarwirksamkeit auch nach Stunden zu beeinflussen, besonders wenn Strychnin 1:10000 davor schützt.

Substanz P. Herr Professor Ulf S. von Euler hat mir für diese Untersuchungen eine aus Pferdedarm gewonnene Probe P, 4 E/mg fester Substanz übergeben, wofür ich hier herzlich danken möchte. An der Capillarwirksamkeit am Ohr gemessen, zeigte sich in 7 Versuchen eine große Konstanz des Verhältnisses D zu P. Es waren Lösungen von über 0,75 E/ml und unter 2 E/ml gleich D. Dagegen ergaben dieselben Lösungen D und P am Ileumpräparat gegeneinander ausgewertet große Schwankungen. 0,25 bis 4 E/ml P waren gleich D. Erhitzt man eine Lösung von P im kochenden Wasserbad 3 min bei p_H 11,0, so nimmt die Darmkomponente auf 75% ab; ob die Capillarkomponente parallel dazu abnimmt, war wegen der geringeren Unterschiedsempfindlichkeit des Ohrtestes nicht zu entscheiden. Bei p_H 11,2 nahmen Darm- und Capillarkomponente jedenfalls gleich stark auf die Hälfte ab.

Adenosintriphosphat. Nach Holton u. Holton verhält sich die nervös ausgelöste antidrome Gefäßerweiterung ähnlich wie die Gefäßerweiterung auf arterielle Injektion von ATP-Lösung oder Rückenmarkswurzelextrakt hin und es tritt nach antidromer Reizung im Ohrperfundat bei spektroskopischer Untersuchung UV-Adsorption an der Stelle auf, an der auch ATP-Lösungen intensiv absorbieren. ATP-Lösungen eines Präparates der Laevosan-Gesellschaft, Linz, das in 1,205 g 1 g Mononatrium-adenosintriphosphat enthält, zeigte sich mit 0,4—0,6 mg/ml gleich capillarwirksam wie Extrakt D und mit 0,35, 0,4 und 0,5 mg/ml gleich darmwirksam wie D. ATP unterschied sich von D dadurch, daß Capillar- und Darmeffekt bei p_H 11,1 (3 min 100°) unverändert blieben, überdies sich auch bei p_H 2,5 (3 min 100°) nicht änderten. Nach diesen Versuchen scheint für die Wirksamkeit der Kochextrakte ATP nicht verantwortlich.

Besprechung der Ergebnisse.

Folgende Eigenschaften teilt die im Kochextrakt der dorsalen Rükkenmarkswurzeln enthaltene, capillarerweiternde Substanz mit A. Ch. im analogen Extrakt der ventralen Wurzeln: Hohe Empfindlichkeit gegen Alkali und Hitze bei Stabilität im schwach sauren Bereich, Unlöslichkeit in Äther, Adsorbierbarkeit an Silikagel und Dialysierbarkeit (Ultrafiltrierbarkeit). Der Mangel an Spezifität im Nachweis der capillar-

wirksamen Substanz in D erfordert begleitstoffarme Extrakte. Eindeutige DV-Unterschiede als Kriterium genommen zeigen Kochextrakte, besonders auch nach Behandlung mit absolutem Alkohol oder nach Fällung mit kolloidalem Eisenoxyd. Direkte Alkoholextrakte werden für den Capillartest erst nach Herauslösen der hier mehr als sonst vorhandenen rötenden Begleitstoffe mittels Äther brauchbar. Unterschiede der Extraktionsart schränken so auch die Vergleichbarkeit der von Holton u. Holton und Holton u. Perry erhobenen Befunde mit jenen von Umrath und mir wesentlich ein.

Die von Euler, Euler u. Gaddum, Gaddum u. Schild und Gullbring im Darmtest geprüften Eigenschaften von P stimmen mit jenen der darmwirksamen Komponente in D überein. Ein und dieselben Lösungen ergeben aber an den einzelnen Darmstücken ein verschiedenes Verhältnis D zu P. Außerdem ist die Capillarwirksamkeit von D besonders empfindlich gegen Alkali, während die Capillarwirksamkeit von P und die Darmwirksamkeit von P und von D viel resistenter sind. Ist P entgegen der Annahme von Fischer u. Vogt einheitlich, so muß also D zwei von P verschiedene Faktoren enthalten. Für die Bedeutung des capillarwirksamen Faktors als Aktionssubstanz der sensiblen Nerven ist neben den früheren Ergebnissen die A. Ch.-Ähnlichkeit im chemischen Verhalten anzuführen. Gegen eine solche Bedeutung des darmwirksamen Faktors spricht u. a., daß Extrakt V nur an Präparaten eines bestimmten Ileumstückes unwirksam, an anderen Stücken aber wirksam ist, eventuell sogar stärker als D.

Zusammenfassung.

Extrakte dorsaler Wurzeln enthalten eine im Kaninchenohrtest nachweisbare, capillarerweiternde Substanz, die gleichbereiteten Extrakten ventraler Wurzeln weitgehend fehlt. Sie ist empfindlich gegen Ozon, Alkali und Hitze, nur im schwach sauren Bereich stabil, sie ist wasserlöslich, ätherunlöslich, mit kolloidalem Eisenoxyd nicht fällbar, läßt sich leicht an Aluminiumoxyd, Aktivkohle und Silikagel adsorbieren und ist dialysabel bzw. ultrafiltrierbar. Substanz P ist resistenter gegen Alkali, ebenso resistent aber sind Kontraktionseffekte der Hinterwurzelextrakte am isolierten Meerschweinchenileum. ATP ist alkaliunempfindlich und zeigt die capillarerweiternden, darmkontrahierenden Effekte der Hinterwurzelextrakte erst in Konzentrationen von 0,4 mg/ml.

Literatur.

Dale, H. H.: Proc. Roy. Soc. Lond. B **28**, 312 (1935). — v. Euler, U. S.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 181 (1936). — Skand. Arch. Physiol. **73**, 142 (1936). — Acta physiol. scand. **11**, 373 (1942). — v. Euler, U. S., and J. H. Gaddum: J. of Physiol. **72**, 74 (1931). — Fischer, H., u. W. Vogt: Arch. exper.

Path. u. Pharmakol. **210**, 91 (1950). — Florey, E.: Z. vergl. Physiol. **33**, 327 (1951). — Pflanzenschutzberichte **7**, 81 (1951). — Gaddum, J. H., and H. Schild: J. of Physiol. **83**, 1 (1934). — Gullbring, B.: Acta physiol. scand. **6**, 246 (1943). — Häusler, H. F., u. H. F. Hellauer: Wiener med. Wschr. **1950**, 40. — Hellauer, H.: Pflügers Arch. **242**, 382 (1939). — Hellauer, H., and K. Umrath: J. of Physiol. **106**, 20 P (1947). — Pflügers Arch. **249**, 619 (1948). — Z. Vit.-, Horm.-, Fermentforschg, Wien **3**, 244 (1949). — Holton, F. A., and P. Holton: J. of Physiol. **118**, 18 P (1952); **116**, 35 P (1952). — Holton, P., and W. L. M. Perry: J. of Physiol. **114**, 240 (1951). Lembeck, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 197 (1953). — Lewis, Th., and H. M. Marvin: J. of Physiol. **62**, 19 P (1926). — Loewi, O.: Pflügers Arch. **189**, 239 (1921). — Loewi, O., u. H. Hellauer: Pflügers Arch. **240**, 769 (1938). — Lueken, B.: Z. Biol. **99**, 551 (1940). — Umrath, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 148 (1953). — Umrath, K., u. H. F. Hellauer: Pflügers Arch. **250**, 737 (1948).

Privat-Dozent Dr. H. Hellauer,
Physiol. Abt. des Paracelsus-Inst., Bad Hall, Oberösterreich.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 242—247 (1953).

Aus der Physiologischen Abteilung, Medizinische Fakultät, Stockholm und der Physiologischen Abteilung der Medizinischen Hochschule, Göteborg.

Einfluß verschiedener afferenter Nervenreize auf die Zusammensetzung des Nebennierenmarkinkretes bei der Katze*.

Von

U. S. von Euler und B. Folkow.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 26. Februar 1953.)

Das Vorkommen beträchtlicher Mengen Noradrenalin nebst Adrenalin im Nebennierenmark der Katze läßt vermuten, daß Noradrenalin die Rolle eines Hormons einnimmt. Durch Analyse des Nebennierenvenenblutes ist erwiesen worden, daß tatsächlich auch Noradrenalin durch verschiedene Reize sezerniert werden kann.

Bülbring und Burn[4] fanden mittels Auswertung der Wirkungen im selben Tier, daß bei wiederholter elektrischer Splanchnicusreizung die relative Menge von Noradrenalin stark schwankte (von 20—80% der Totalkatechole).

Bei differenzierter Bestimmung von Noradrenalin und Adrenalin fanden Kaindl und Euler[11], daß der Hauptanteil der ins Nebennierenvenenblut der Katze abgegebenen Katecholamine Noradrenalin ist. Dies war sowohl für die Ruhesekretion wie auch für die erhöhte Abgabe während Carotisabklemmung der Fall. Daß die totale Katecholabgabe unter der letztgenannten Bedingung erhöht ist, wurde schon von Brauner, Brücke, Kaindl und Neumayr[2] gezeigt.

Von großem Interesse waren die Angaben von Brücke, Kaindl und Mayer[3], daß die relativen Anteile der beiden Katechole bei Ruhesekretion und Hypothalamusreiz voneinander abweichen. Sie fanden, daß während Ruhesekretion Noradrenalin im Durchschnitt 88% der Totalkatechole ausmachte, wogegen der Noradrenalinanteil bei Hypothalamusreiz durchschnittlich 55% betrug. Da aus den Versuchen von Kaindl und Euler[11] zu entnehmen ist, daß die Zusammensetzung des Nebennierenmarksekretes prozentual etwa gleich ist bei Ruhesekretion und bei Carotisabklemmung, so folgt daraus, daß durch Hypothalamusreiz die qualitative Zusammensetzung des in erhöhter Menge abgegebenen Sekretes zugunsten des Adrenalins verändert ist.

Outschoorn[12] verglich die relativen Mengen von Adrenalin und Noradrenalin im Nebennierenvenenblut der Katze bei elektrischer Splanchnicusreizung, nach Acetylcholin und nach Kalium. Die qualitative Zusammensetzung des Inkretes blieb bei diesen Reizformen unverändert. Die relativen Mengen von Adrenalin und Noradrenalin waren anscheinend nicht vom Reizmodus abhängig.

Auch Vogt[14] fand keinen Unterschied in der Proportion der Katecholamine, die man bei elektrischer Splanchnicusreizung bei der normalen Katze findet und bei Injektion von KCl in Katzen bei denervierten Nebennieren.

---

* Herrn Dr. O. Loewi - New York zum 80. Geburtstag gewidmet.

Da viele Tatsachen für die Auffassung sprechen, daß Noradrenalin ein spezifisches Hormon des Nebennierenmarks ist und vielleicht durch spezifische Zellen mit eigener Innervation produziert und sezerniert wird, haben wir das Nebennierenblut auf seinen Gehalt an Noradrenalin und Adrenalin während verschiedener Reizformen untersucht. Die Reizbedingungen wurden so gewählt, daß die verschiedenen postulierten Funktionen der beiden Hormone zur Geltung gebracht werden konnten. Zu diesem Zweck haben wir einmal die Einwirkung von Carotisabklemmung und zweitens den Einfluß afferenter Erregung von Ischiadicus bzw. Plexus brachialis auf die qualitative Zusammensetzung des Nebennierenvenenblutes geprüft. Die erste Reizform dürfte hauptsächlich in das Gebiet der Reizmechanismen fallen, die der Blutdruckhomöostasis dienen, während die zweite als Beispiel eines „stress"-Reizes gelten dürfte. Ferner wurden eine Anzahl Bestimmungen der Zusammensetzung des Inkretes bei elektrischer Splanchnicusreizung und bei Asphyxie gemacht.

Methodisches.

Alle Versuche wurden an Katzen von etwa 2,5—4,5 kg ausgeführt. Die Versuche wurden so angeordnet, daß die Reizversuche nebst Aufsammeln der Blutproben von B. Folkow gemacht wurden, wonach die Plasmaproben von U. S. von Euler analysiert wurden.

Die Tiere wurden mit Chloralose narkotisiert (50—60 mg pro kg i. v., in einigen Fällen mit Zusatz von 100 mg/kg Urethan). Die Blutproben wurden nach dem Verfahren von Brauner u. Mitarb.[2] gewonnen. Eine Kanüle wurde in die linke V. lumbalis oder V. renalis eingeführt unter Abbindung aller Seitenäste, damit reines Nebennierenvenenblut aufgesammelt werden konnte. Während der Aufsammlung des Nebennierenvenenblutes wurde der Abfluß zur Vena cava mit einer Fadenschlinge gedrosselt. Das ganze Tier wurde heparinisiert. Der an die Kanüle angeschlossene Polyäthylenschlauch wurde durch die Bauchwand geführt und das Abdomen geschlossen. Zwischen jedem Reiz wurden einige ml Blut aus dem Schlauch entnommen, damit nicht Spätwirkungen das Ergebnis einer darauffolgenden Probe beeinflussen konnten. Etwa 4—6 ml Blut wurde während jedes Reizes gesammelt, was meistens etwa 2—6 min dauerte. Das Blut wurde unmittelbar zentrifugiert und das Plasma auf Kohlensäureschnee in geschlossenen Röhrchen aufbewahrt und versandt.

Die Vagusnerven wurden durchschnitten, damit die Wirkung von Carotissinusentlastung nicht durch die Depressorenreflexe kompensiert werden konnte.

Bei den Reizversuchen wurden die zentralen Stümpfe vom Ischiadicus bzw. Plexus brachialis mittels rektangulären Stromes gereizt. Pulszeit 1—2 msec, Frequenz 20 pro sec. Die Reizspannung war 6—10 Volt, was zur Erregung der Schmerzfasern ausreichte (Abwehrreflexe, Atmungssteigerung).

Die Analyse auf Noradrenalin und Adrenalin geschah am Katzenblutdruck und rectalen Hühnerzöcum nach dem Verfahren von Euler[5]; die Konzentrationen wurden nach der dort angegebenen Formel berechnet. Meistens wurden die Proben an zwei verschiedenen Testpräparaten geprüft und der Mittelwert genommen. Doppelbestimmungen an verschiedenen Präparationen stimmten binnen etwa 10% am Katzenblutdruck und etwa 25% am Hühnerdarm überein. Die Plasmaproben wurden bis zur Prüfung in gefrorenem Zustand aufbewahrt.

Insgesamt wurden 15 Versuche durchgeführt, wovon 11 für den Vergleich zwischen dem Sekret bei Carotisocclusion und bei afferentem Nervenreiz verwertet werden konnten.

Versuchsergebnisse.

Tab. 1 gibt die pro kg Körpergewicht und Minute berechneten Werte in μg Noradrenalin und Adrenalin (als Hydrochloride) wieder.

Tabelle 1. *Sekretion in μg pro kg und Minute von Adrenalin (A) und Noradrenalin (NA) bei verschiedenen Reizen bei der Katze.*

Versuch Nr.	Carotissinus-entlastung			Ischiadicusreiz Pl. brachialisreiz			Elektr. Splanchn.-Reiz			Asphyxie		
	A	NA	%A	A	NA	%A	A	NA	%A	A	NA	%A
2	0,090	0,11	44	0,58	0,069	90	0,26	0,70	28	0,33	0,87	28
3	0,11	0,4	34	0,15	0,19	44	0,52	1,5	26	0,50	1,1	32
5	0,013	0,12	10	0,021	0,067	24	0,11	0,93	11	0,28	1,1	20
6	0,034	0,088	28	0,067	0,078	47				0,12	0,27	31
7	0,053	0,26	17	0,072	0,24	23	0,12	1,6	7	0,056	0,47	11
8	0,016	0,098	14	0,034	0,10	25	0,11	0,46	19	0,095	0,63	13
10	0,056	0,098	36	0,21	0,056	79	1,1	1,4	45			
11	0,13	0,21	38	0,20	0,13	61	0,37	0,74	33			
12							0,43	0,75	37			
13	0,044	0,16	23	0,11	0,070	62	0,82	1,2	41			
14	0,20	0,45	30	0,54	0,28	66						
15	0,11	0,35	24	0,33	0,49	40						
% A		(10-44)	28		(23-90)	57		(7-45)	25		(11-32)	22
% NA		(56-90)	72		(10-77)	43		(55-93)	75		(68-89)	78

Aus der Tabelle ist die große Variation der absoluten Zahlen ersichtlich. Wenn aber die Durchschnittswerte berechnet werden, stimmen sie mit den Zahlen anderer Verfasser recht wohl überein, wie die Tab. 2 zeigt. Es ist somit ersichtlich, daß die Sekretion bei Carotisabklemmung an der Katze zu etwa $^3/_4$ aus Noradrenalin besteht, was als ein direkter Hinweis darauf angesehen werden darf, daß diese Substanz zur Erhaltung der Blutdruckhomöostasis von Bedeutung ist.

Die Zahlen der Noradrenalin- und Adrenalinausschüttung bei elektrischer Erregung der zentralen Stümpfe des Ischiadicus oder Plexus brachialis ergeben ein ganz anderes Bild. Wie zu erwarten war, gibt es auch hier beträchtliche Unterschiede zwischen den Zahlen der einzelnen Versuche. Der durchschnittliche Wert von Noradrenalin liegt auch hier bei 0,16 μg pro kg und Minute, also etwa wie bei Carotisabklemmung. Hingegen liegen die Adrenalinzahlen weit über denjenigen bei Carotisocclusion, und zwar bei 0,21 μg pro kg und Minute. Somit ergibt sich ein prozentualer Anteil von Noradrenalin mit 43% oder wenig mehr als die Hälfte desjenigen bei Carotisabklemmung.

Wegen der großen Streuung der absoluten Zahlen wie auch der prozentuellen Werte sind die Standardabweichungen groß, wenn sie auch einen signifikanten Unterschied zwischen dem relativen Adrenalingehalt bei den beiden Reizformen aufweisen. Wir haben deshalb die Prozent-

Tabelle 2.

	Noradrenalin	Adrenalin	% Noradrenalin	Autoren
µg/kg/min	0,16	0,051	76	Kaindl u. Euler, 1951
„	0,14	0,050	74	Brücke u. Mitarb. 1952
µg/ml	0,35	0,15	70	Holtz u. Mitarb. 1952
µg/kg/min	0,20	0,077	72	Euler u. Folkow 1953

zahl bei Carotisabklemmung in Relation zu den zugehörigen Prozentzahlen bei Ischiadicus- oder Plexus-brachialis-Reiz im selben Tierversuch gestellt. Die so erhaltenen Relationszahlen liegen einander näher, offenbar wegen einer Korrelation der Prozentzahlen bei den verschiedenen

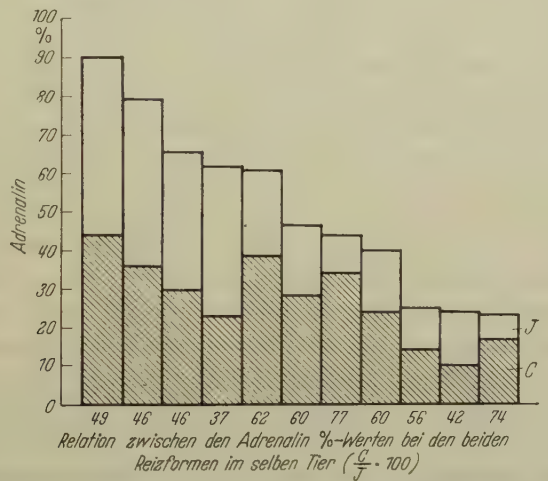


Abb. 1. Das Diagramm zeigt den prozentualen Adrenalinanteil der Totalcatechole im Nebennierenplasma der Katze bei Ischiadicus- oder Plexus brachialis-Reiz (J) und bei Carotissinusentlastung (C) (schraffierter Teil) in 11 Versuchen.

Reizen in einem und demselben Tier. Die Relation wird in Abb. 1 anschaulich gemacht.

Die Relation der Adrenalinprozente in den beiden Serien beträgt im Mittel 55,4% ($\pm$ 4,12) d. h. die Adrenalinprozentzahl im Sekret bei Carotisabklemmung ist durchschnittlich nur etwas mehr als halb so groß als diejenige bei Ischiadicus- oder Brachialis-plexus-Reiz im selben Versuchstier.

Diskussion.

Brücke, Kaindl und Mayer[3] haben den Nachweis erbracht, daß die Zusammensetzung des Nebennierenmarkinkretes bei Hypothalamusreiz verschieden ist von derjenigen bei Ruhesekretion. Die hier mitgeteilten Versuchsergebnisse zeigen, daß auch verschiedene andere Reizformen eine beträchtliche Differenz in der Zusammensetzung des Sekretes herbeiführen.

Die von Outschoorn[12] und Vogt[14] benutzten Reizformen waren offenbar nicht geeignet, um eine solche Differenz zu enthüllen, und sie haben deshalb den Schluß gezogen, daß die Katecholamine im abgegebenen Inkret etwa dieselbe Proportion aufweisen, wie im Nebenierenmark selbst.

Holtz und Mitarb.[10] haben das Ergebnis von Kaindl und Euler[11] bestätigt, nämlich daß Carotisabklemmung keine qualitative, sondern nur eine quantitative Veränderung (Vermehrung) der Marksekretion herbeiführt. Andererseits haben Holtz und Mitarb.[10] angegeben, daß bei Splanchnicusreizung die relative Noradrenalinmenge sehr klein war, so daß fast reines Adrenalin sezerniert wird. Daß die Proportionen der Katecholamine innerhalb weiter Grenzen schwanken können, zeigten bereits Bülbring und Burn[4]. In unseren diesbezüglichen 8 Versuchen schwankte der Noradrenalingehalt zwischen 55% und 93%, im Durchschnitt 75%, d. h. etwa wie bei Carotisabklemmung oder bei der Ruhesekretion. Über die Ursache der großen Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und denjenigen von Holtz und Mitarb.[18] können wir uns nicht äußern. Auch bei Asphyxie ergaben sich in unseren Versuchen ähnliche Werte (68—89%, im Durchschnitt 78%, bei 6 Versuchen). In Hundeversuchen fanden Rapela und Houssay[13] keine Verschiebung der relativen Mengen der beiden Katechole als Folge von Asphyxie.

Wenn es zur Deutung unserer Versuchsergebnisse kommt, glauben wir, daß sie — wie auch diejenigen von Brücke und Mitarb.[3] — eine starke Stütze für die Anschauung darbieten, daß verschiedene Reize verschiedene Zellgruppen aktivieren, die entweder hauptsächlich Noradrenalin oder Adrenalin als Sekretionsprodukt liefern.

Die Angaben von Sallé, daß Diethylmethylphosphonat eine selektive Noradrenalinausschüttung beim Hund herbeiführen sollte, hat zu demselben Schluß geführt (Beauvallet, le Breton und Sallé[1]). Die Annahme von verschieden innervierten Adrenalin- und Noradrenalinzellen ist schon durch den Befund von Hökfelt[9] wahrscheinlich gemacht, daß Insulinhypoglykämie eine selektive Verarmung der Markes an Adrenalin herbeiführte, während die Noradrenalinmenge weitgehend erhalten war, was auch von Outschoorn[12] bestätigt wurde. Ferner zeigten Euler und Luft[7], daß Insulinhypoglykämie bei normalen Versuchspersonen von einer etwa 10fachen Erhöhung der Adrenalinabgabe durch den Harn gefolgt war, ohne daß die Noradrenalinausscheidung erhöht war. Anderseits kann eine selektiv erhöhte Noradrenalinausscheidung (Forssman u. Mitarb.[8]), oder auch,

wie bei starker Muskelarbeit, eine gemischte gleichmäßige Erhöhung beider Komponente vorkommen (Euler und Hellner[6]). Für die Annahme etwa einer hormonellen Beeinflussung der Zusammensetzung des Inkretes, z. B. durch Einwirkung auf die Synthese bei verschiedenen Reizungsformen, besteht zumindest keine Stütze.

Zusammenfassung.

Der Noradrenalingehalt im Nebennierenvenenplasma von chloralosierten Katzen betrug bei Carotisabklemmung im Durchschnitt bei 11 Versuchen 0,20 μg per kg und Minuten oder 72% (56—90%) der Summe von Adrenalin und Noradrenalin, was mit Befunden früherer Untersuchungen im Einklang steht.

Bei afferenter Ischiadicus- oder Plexus-brachialis-Reizung war die Noradrenalinsekretion ähnlich, oder 0,16 μg per kg und Minute, was aber nur 43% der Totalkatechole ausmachte.

Die Relation zwischen dem Prozentgehalt Adrenalin bei Carotidenabklemmung und bei Ischiadicus- oder Brachialisreiz im selben Tier betrug in 11 Versuchen 55,4% ($\pm$ 4,1).

Bei elektrischer Splanchnicusreizung enthielt die Sekretion in 9 Versuchen durchschnittlich 73% Noradrenalin (55—93%); bei Asphyxie durch Trachealverschluß (in 6 Versuchen) 78% Noradrenalin (68—89%).

Die Ergebnisse werden als Stütze für die Annahme von getrennt innervierten, hauptsächlich Adrenalin- bzw. Noradrenalin produzierenden Zellen im Nebennierenmark gedeutet, die durch spezifische Reize zur Sekretion gebracht werden.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung von „Statens Medicinska Forskningsräd" ausgeführt.

Literatur.

[1] Beauvallet, M., E. Le Breton u. J. Sallé: C. r. Acad. Sci. Paris **232**, 1243 (1951). — [2] Brauner, F., F. Brücke, F. Kaindl u. A. Neumayr: Arch. internat. Pharmacodynamie **83**, 505 (1950). — [3] Brücke, F., F. Kaindl u. H. Mayer: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 407 (1952). — [4] Bülbring, E., u. J. H. Burn: Brit. J. Pharmacol. **4**, 202 (1949). — [5] Euler, U. S. v.: Acta physiol. Scand. **19**, 207 (1949). — [6] Euler, U. S. v., u. S. Hellner: Acta physiol. Scand. **26**, 183 (1952). — [7] Euler, U. S. v., u. R. Luft: Metabolism (Baltimore) **1**, 528 (1952). — [8] Forssman, O., F. Hansson u. C. C. Jensen: Acta med. scand. (Stockh.) **142**, 441 (1952). — [9] Hökfelt, B.: Acta physiol. Scand. **25**, Suppl. 92 (1951). — [10] Holtz, P., A. Engelhardt, K. Greeff u. H.-J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 58 (1952). — [11] Kaindl, F., u. U. S. v. Euler: Amer. J. Physiol. **166**, 284 (1951). — [12] Outschoorn, A. S.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 605 (1952). — [13] Rapela, C. E., u. B. A. Houssay: Rev. Soc. Argent. Biol. **28**, 7 (1952). — [14] Vogt, M.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 325 (1952).

Prof. U. S. von Euler, M. D. Stockholm, Solnavägen 1.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 248—262 (1953).

Aus dem Institut für Experimentelle Medizin der University of Vermont, Burlington, Vermont/USA. (Vorstand: Prof. Dr. W. Raab).

Die Katecholamine des Herzens* **.

Von

W. Raab und W. Gigee.

(Eingegangen am 26. April 1953.)

Die von O. Loewi[31] im Jahre 1921 gemachte Entdeckung der chemischen Nervenreizübertragung bedeutete nicht nur den Beginn einer neuen Aera in der Physiologie und Pharmakologie des vegetativen Nervensystems, sondern eröffnete auch ungeahnte Perspektiven hinsichtlich des pathogenetischen Mechanismus jener kardiovasculären Erkrankungsformen, in denen neurovegetative Faktoren eine ausschlaggebende Rolle spielen. Dies trifft insbesondere auf den Herzmuskel zu, insoferne als das Phänomen der stoffwechselbedingten Myokardhypoxie die Grundlage sowohl akuter (Angina pectoris) als chronischer (Myokarddegeneration und -schwäche) Störungen bildet[43], denn von Gollwitzer-Meier u. Mitarb.[18, 19], Eckstein u. Mitarb.[8], García-Ramos und de Arellano[17] und anderen ist der Beweis erbracht worden, daß unter der Einwirkung der sympathikogenen Katecholamine der Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels weit über das zur Deckung des gesteigerten Arbeitsenergiebedarfes hinaus erforderliche Maß ansteigt, so daß die „Coronarreserve" (Schimert[52]) erschöpft und somit unter Umständen eine „katastrophale"[18] Myokardhypoxie herbeigeführt werden kann.

Von den beiden wichtigsten adreno-sympathogenen Katecholaminen Adrenalin und Arterenol (Noradrenalin) besitzt das erstere, zumindest nach Beobachtungen am Gesamtorganismus, eine bedeutend stärkere oxydationssteigernde Wirkung[24, 28, 33]. Es erscheint deshalb von physiopathologischem Interesse, sich so weit als möglich sowohl über die absolute als die relative Konzentration der adreno-sympathogenen Katecholamine im Myokard, ihre experimentelle Beeinflußbarkeit und ihr Verhalten bei pathologischen Zuständen zu informieren.

Die ältesten Befunde betreffend das Vorhandensein von zunächst chemisch unidentifizierten kardioacceleratorischen Stoffen im Herzen stammen von O. Loewi[31], Demoor[7] und Haberlandt[21, 22]. Der letztere kam zu der Auffassung, daß das von

* Die in dieser Arbeit besprochenen eigenen Untersuchungen sind mit teilweiser Unterstützung durch den Öffentlichen Gesundheitsdienst der Vereinigten Staaten (National Heart Institute) durchgeführt worden.

** Herrn Professor Dr. Otto Loewi, dem Entdecker der Katecholamine des Herzens zum 80. Geburtstage gewidmet.

ihm so benannte „Herzhormon" nicht sympathogenen Ursprungs sei, da seine Wirkung nicht wie die des Adrenalins durch Ergotamin verhindert wurde. So blieb es O. Loewi vorbehalten, den adrenergischen Charakter des „Acceleransstoffes" im Jahre 1936 festzulegen[32]. Die von ihm, ebenso wie später von Bacq u. Fischer[2] und von Cannon u. Lissák[6] vertretene Auffassung, es handle sich um Adrenalin, sowie Mitteilungen betreffend die Entladung einer „adrenalinähnlichen" Substanz in das Coronarblut[16, 23] sind allerdings auf Grund neuerer Erkenntnisse heute dahingehend zu modifizieren, daß der Herzmuskel von Säugetieren und Menschen neben Adrenalin bedeutende Mengen, in der Regel sogar vorwiegend, Arterenol enthält [10, 20, 25, 48], und daß wärend elektrischer Reizung des Herzsympathicus, zumindest beim Hund, nahezu reines Arterenol im Coronarblut erscheint[34]. Nur das Froschherz ist bisher als ausschließlich Adrenalin enthaltend befunden worden[6, 25, 32].

Was die quantitative Bestimmung der Gesamtkatecholamine im Herzmuskel verschiedener Spezies betrifft, so liegen diesbezüglich in der Literatur mehrere, allerdings den verschiedenen Untersuchungsmethoden entsprechend einigermaßen divergierende Angaben vor (Tab. 3).

Die von Shaw[53] angegebene und vom Verfasser[36] leicht modifizierte colorimetrische Methode beruht auf Adsorption der Katecholamine an $Al(OH)_3$ bei alkalischer Reaktion und Blaufärbung eines Arsenmolybdat-Reagens. Sie besitzt den Vorzug verhältnismäßig einfacher Durchführbarkeit und Anwendbarkeit für Serienbestimmungen auch an kleinen Gewebsmengen (von 500 mg aufwärts), erfordert aber eine subtile und in allen Einzelheiten streng standardisierte Technik. Ihr Hauptnachteil ist die Problematik der Deutung der mit ihr gewonnenen Ergebnisse[55], da sich an dem Endresultat verschiedene Katecholverbindungen von ungleicher Färbekraft beteiligen. Verschiedene unspezifische, chromogene, reduzierende Substanzen werden zwar in den Anfangsstadien des Verfahrens eliminiert, aber das Prinzip der Adsorption aller einen Benzol- oder Laktonring mit 2 oder mehr freien Hydroxylgruppen in Orthostellung enthaltenden Stoffe[37] schließt außer Adrenalin, nach dessen Färbekraft die Ablesungen berechnet sind, auch Arterenol ein, dessen Färbekraft nur etwa ein Viertel von der des Adrenalins beträgt, ferner Ascorbinsäure (etwa $^1/_{320}$ der Färbekraft des Adrenalins) und möglicherweise noch gewisse unidentifizierte Katecholamine von unbekannter Färbekraft.

Tabelle 1. *Aufnahme intraperitoneal injizierter nicht sympathogener Katecholamine durch den Herzmuskel der Ratte.*

Injizierte Substanz	Färbekraft verglichen mit der des Adrenalins	Dosis γ/g*	Intervall zwischen Injektion und Tötung (min)	Colorimetrisch i. Herzmusk. aufgefundene Menge (Dchschn.) γ/g**
Dioxyphenylalanin . .	1:3	300	60—120	24
Oxytyramin	1:70	400	30	35
Isopropyl-Noradrenalin	1:5	50	40	23

* Gamma per Gramm Körpergewicht.
** Gamma per Gramm Herzmuskel.

Die chromogenen, den Katecholkern enthaltenden Adrenalinvorstufen Dioxyphenylalanin und Oxytyramin werden nach Injektion vom Herzmuskel in großen Mengen aufgenommen (Tab. 1), und Oxytyramin ist

im Herzen des Schafes mittels Papier-Chromatographie auch unter normalen Bedingungen nachgewiesen worden[20]. Das blutdrucksenkende Isopropyl-Noradrenalin wird nach intraperitonealer Injektion gleichfalls im Herzmuskel abgelagert (Tab. 1).

Das gelegentliche Vorhandensein den Katzenblutdruck flüchtig senkender Begleitsubstanzen in den pressorischen Herzextrakten erinnert an die Effekte der vasodepressorischen N-Alkylamine des Noradrenalins[27, 29, 49]. Es dürfte sich jedoch weder um Isopropyl- noch um Äthyladrenalin handeln, da deren drucksenkende Wirkung langsamer abläuft als die der in Frage stehenden Substanzen[48]. — Auch an eine Beteiligung des von Lehmann[30] so bezeichneten „Adrenalinogens" an den Extra-Katecholaminen des Herzens kann vielleicht gedacht werden.

Tabelle 2. *Experimentell hervorgerufene Abweichungen des colorimetrisch bestimmten Gesamtkatecholamingehaltes des Herzens vom Normal-Durchschnitt.*
(Nach Raab[35, 36, 40, 42, 46, 47, 50, 51].)

Experimentelle Maßnahmen	Dosis	Tiergattung	Durchschnittl. Abweichg. vom Normaldurchschnitt	Zahl der Versuche
Adrenalin (intraperitoneal) . . .	2,5 γ/g	Ratte	+ 55%	15
Adrenalin (i.p.)	5,0 γ/g	Ratte	+123%	15
Adrenalin (i.p.)	7,5 γ/g	Ratte	+277%	6
Adrenalin (i.p.)	10,0 γ/g	Ratte	+308%	10
Arterenol (intraperitoneal) . . .	10,0 γ/g	Hund	+ 63%	2
Faradische Reizung d. Ganglion stellatum . .		Katze	+ 35%	10
Faradische Reizung d. Splanchnicus		Katze	+ 21%	10
Acetylcholin i.v. . . .	10 mg/kg	Katze	+ 35%	10
Insulin	3—18 Einh.	Ratte	+116%	10
Muskelarbeit (Schwimmen, 11—420 min) . .		Ratte	+ 88%	30
Unterkühlung (10 min in Wasser, 5°)		Ratte	+ 77%	10
Vitamin B_1-Mangel . .		Ratte	+ 40%	9
Adrenalektomie		Ratte	— 22%	9
Sympathektomie (Herz)		Katze	— 44%	5
Sympathektomie (total) plus Adrenalektomie .		Katze	— 44%	4

Eigene ausgedehnte Untersuchungen mittels colorimetrischer Bestimmungen der Gesamtkatecholamine des Herzens (Tab. 2) haben bisher folgende Daten ergeben: Der Herzmuskel nimmt injiziertes Adrenalin und Arterenol weitaus gieriger auf als andere Gewebe (Niere, Leber, Muskel, Milz, Gehirn), und zwar in Proportion zu der verabreichten Dosis[36, 42]; die Katecholamine des Herzmuskels werden durch Reizung des Herzsymphathicus (Neurosekretion)[46, 47] und des Splanchnicus

(Nebennierenmark-Entladung)[46] erhöht, durch Adrenalektomie und Sympathektomie vermindert[50] (von GOODALL[20] und anderen Autoren[1, 6] bestätigt); Muskelarbeit und Kälteeinwirkung vermehren die Herz-Katecholamine[42], wahrscheinlich durch kombinierte sympathische Neurosekretion und Adrenalinentladung aus dem Nebennierenmark; Acetylcholin[46] und Insulin[35] steigern den Katecholamin-Gehalt des Herzens gleichfalls, offenbar hauptsächlich infolge sekundärer Adrenalinsekretion; Vitamin B 1-Mangel verursacht eine abnorme Erhöhung des myokardialen

Tabelle 3. *Gesamtkatecholamine im Herzmuskel verschiedener Spezies.*

Spezies	Methode	Gamma* per Gramm Herzmuskel	Autor
Frosch	Froschherz	1,0—2,0	O. LOEWI[32]
Mensch	Nickhaut	0,3	BACQ u. FISCHER[2]
Katze	Blutdruck der Katze	0,5—0,8	CANNON u. LISSÁK[6]
Rind, Pferd, Katze	Blutdruck der Katze	etwa 5.0	v. EULER[10]
Frosch	Colorimetrie*	0,3—1,2	SHAW[53]
Kaninchen	Colorimetrie*	0,015—0,04	SHAW[53]
Ratte	Colorimetrie*	0,3—1,9	RAAB[37, 40]
Katze	Colorimetrie*	0,9—1,8	RAAB u. HUMPHREYS[47]
Mensch	Colorimetrie*	0,3—1,1	RAAB[36]
Rind	Colorimetrie*	1,2—2,0	RAAB[44]
Rind	Kombinierte biolog. Methode**	0,17—0,31	HOLTZ u. Mitarb.[25]
Rind	Kombinierte biolog. Methode**	0,18—0,36	GOODALL[20]
Ratte	Kombinierte biolog. Methode**	0,76	GOODALL[20]
Schaf	Kombinierte biolog. Methode**	0,94	GOODALL[20]
Kaninchen	Kombinierte biolog. Methode**	0,21—0,64	HOLTZ u. Mitarb.[25]
Schwein	Kombinierte biolog. Methode**	0,32—0,59	HOLTZ u. Mitarb.[25]
Meerschw.	Kombinierte biolog. Methode**	0,45—1,27	HOLTZ u. Mitarb.[25]
Frosch	Kombinierte biolog. Methode**	5,0—8,3	HOLTZ u. Mitarb.[25]
Mensch	Kombinierte biolog. Methode**	0,03—0,31	HOLTZ u. Mitarb.[25]

* Die mittels der colorimetrischen Methode von SHAW[53], bzw. ihrer Modifikation durch RAAB[36] erhaltenen Ergebnisse beruhen auf Farbeinheiten (siehe Text, S. 252) und sind in der Tabelle als colorimetrische Adrenalin-Gamma-Äquivalente angegeben.

** Blutdruck der Katze und Ratten-Uterus oder Rectal-Coecum des Huhnes. Die hier angeführten Zahlen sind die nach den von den Verfassern angegebenen Minimal- und Maximalwerten für Adrenalin und Arterenol errechneten Summen dieser beiden Komponenten.

Katecholamin-Gehaltes[51] (von Goodall[20] bestätigt), welcher bei Vitamin B 1-Zufuhr prompt zur Norm zurückkehrt[51]; die tödlich wirkende Konzentration injizierten Adrenalins im Herzmuskel wird durch Thyroxin herabgesetzt, durch Schilddrüseninaktivierung (Thiouracil) erhöht[40]. Goodall[20] fand bei thyroxinbehandelten Schafen eine Vermehrung des Arterenoltiters im Herzmuskel, während Thyreoidektomie keine wesentliche Veränderung des Herzkatecholamingehaltes nach sich zog.

Wie aus Tab. 3 ersichtlich, weichen die colorimetrisch ermittelten Werte von den mit den modernen biologischen Methoden gewonnenen zum Teil wesentlich ab. Überdies muß betont werden, daß die colorimetrischen Ergebnisse in den betreffenden Publikationen nicht in Gewichtseinheiten, sondern in Farbeinheiten ausgedrückt sind (1 Farbeinheit oder „c. u." (color unit) entspricht der Farbintensität von 0,001 γ Adrenalin) und im Hinblick auf die relative Farbschwäche des teilnehmenden Arterenols dementsprechend wahrscheinlich noch größere Katecholamin-Gewichtswerte repräsentieren als aus den angeführten Farbeinheitszahlen ersichtlich ist.

Um ein klareres Bild von der Bedeutung der colorimetrischen Ergebnisse und ihrem Verhältnis zu den biologisch ermittelten Adrenalin- und Arterenolwerten im Herzmuskel, sowie von der quantitativen Deutbarkeit der letzteren zu erhalten, wurden die folgenden Versuche angestellt.

Methodik.

a) Modell-Lösungen von Adrenalin und Arterenol (separat und gemischt) wurden dem von v. Euler[11, 12, 13], Goodall[20] und Holtz[25] angegebenen Extraktionsprozeß unterworfen und die resultiernden Extrakte colorimetrisch und biologisch untersucht.

b) In einer Kontrollserie wurden die Herzen von normalen Hunden extrahiert und colorimetrisch sowie biologisch getestet.

c) In gleicher Weise wurden auch die Herzen von Hunden untersucht, denen Adrenalin oder Arterenol oder ein Adrenalin-Arterenol-Gemisch intraperitoneal oder intravenös 8—25 min vor dem Tod injiziert worden war.

d) Die untersuchten Menschenherzen (mindestens 50 g schwere Stücke des li. Ventrikels) stammten von Leichen, die spätestens 12 Std. nach dem Ableben zur Autopsie gekommen waren. Zu Kontrollzwecken bis zu 24 Std. stehengelassener Herzmuskel zeigte einen Farb- und Aktivitätsverlust von nur 11—20% und keine Änderung des gegenseitigen Mengenverhältnisses von aktivem Adrenalin und Arterenol.

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte unter Nembutalanästhesie durch Eröffnung des Thorax und Excision des Herzens. In einigen Fällen trat der Tod nach Adrenalininjektion spontan ein.

Die colorimetrischen Bestimmungen nach Shaw erfolgten in der vom Verfasser an anderer Stelle[36] ausführlich beschriebenen Weise. Die Adrenalin-Standard-Werte wurden mittels eines photoelektrischen Coleman-Colorimeters konstant gehalten.

Die biologische Auswertung der Extrakte wurde nach dem von v. Euler[11, 12, 13], Holtz[25] und Goodall[20] beschriebenen Verfahren am Blutdruck der nebennierenunterbundenen, atropinisierten und von Stunde zu Stunde frisch cocainisierten Katze sowie am isolierten Rectal-Coecum des Huhnes durchgeführt. Bei letzterem

erwies sich uns ein KCl-Gehalt von 0,015% in der Tyrodelösung als optimal für die Reaktivitätskonstanz des Präparates. Gewöhnlich wurden nicht mehr als 2 Herzextrakte an einem und demselben Darmstück geprüft. Zwischen beiden Tests wurde jeweils die Adrenalin- und Arterenol-Empfindlichkeit nachkontrolliert. Im Fall einer nach der Einwirkung größerer Dosen von Herzextrakten häufig feststellbaren Empfindlichkeitsverminderung des Präparates[20] wurde die Bestimmung des Adrenalin-Arterenol-Reaktionsquotienten wiederholt und dem folgenden Extrakt-Test zugrunde gelegt.

Für die Berechnung der Resultate wurden die von obengenannten Autoren benützten Symbole *A*, *a*, *Q*, *q* verwendet. Dagegen wurde der absolute Wert für Gamma Adrenalin per cc Herzextrakt (bei Holtz[25] „*x*") als „*b*", und der für Gamma Arterenol per cc Herzextrakt als „*d*" bezeichnet, ferner die Adrenalin-Prozentzahl als „*e*" und die Arterenol-Prozentzahl als „*f*". Die für *A*, *a*, *Q* und *q* eingesetzten Zahlen waren gewöhnlich Mittelwerte aus 5 oder mehr Einzelablesungen, gewonnen mit Dosen, die bis auf das 10- oder Mehrfache der betreffenden Testsubstanzen und Extraktvolumina stiegen, wobei die mit den Arterenol-Standardreaktionen nicht genau identischen Kurvengipfel der Adrenalindosen und der Extrakte zwischen jene interpoliert und die Äquivalente geschätzt wurden.

Unter Bezugnahme auf das Mengenverhältnis zwischen der Masse extrahierten Herzmuskels und dem Extraktvolumen (z. B. 10 g Herzmuskel per cc Extrakt) wurden aus *b* und *d* die Mengen pharmakologisch wirksamen Adrenalins und Arterenols per Gramm Herzmuskel errechnet. Die Summe der beiden so gefundenen Werte („aktive Extrakt-Katecholamine") wurde mit dem in Farbeinheiten (c. u./g = color units per gram) ausgedrückten colorimetrischen Gesamtkatecholamin-Wert des untersuchten Herzmuskels in folgender Weise verglichen: Unter der (willkürlichen) Voraussetzung, daß sich die Hauptmenge des chromogenen Materials im Herzmuskel aus Adrenalin und Arterenol in gleichem gegenseitigem Mengenverhältnis zusammensetzt wie die mittels biologischer Auswertung gefundenen „aktiven Extrakt-Katecholamine" (siehe oben), und mit Rücksicht darauf, daß die Färbekraft des Adrenalins 4,4mal so stark ist wie die des Arterenols, wurden die folgenden Formeln angewendet:

h = Gamma „hypothetisches Adrenalin" (auf colorimetrisch-biologischer Basis berechnet) per Gramm Herzmuskel $= \dfrac{4{,}4\, e \times \text{c. u./g}}{1000\ (4{,}4\, e + \text{f})}$

i = Gamma „hypothetisches Arterenol" auf colorimetrisch-biologischer Basis berechnet) per Gramm Herzmuskel $= \dfrac{4{,}4\ (\text{c. u./g} - 1000\, h)}{1000}$

$h + i$ = Gamma „hypothetische Gesamt-Katecholamine" (auf colorimetrisch-biologischer Basis berechnet) per Gramm Herzmuskel.

Das Mengenverhältnis der in den Extrakten aufgefundenen pharmakodynamisch „aktiven Extrakt-Katecholamine" zu den auf colorimetrisch-biologischer Basis errechneten „hypothetischen Gesamt-Katecholaminen" wurde in Prozenten der letzteren ausgedrückt. Zum Beispiel wurde ein Mengenverhältnis von 1,0 γ/g „aktiver Extrakt-Katecholamine" zu 4,0 γ/g „hypothetischer Gesamt-Katecholamine" als 25% Aktivität bezeichnet. Trotz seinen offensichtlichen Mängeln schien uns dieses Berechnungsverfahren eine gewisse Basis zur ungefähren Beurteilung des Verhältnisses zwischen den mittels der Aktivitätstests und den colorimetrisch nachweisbaren Gesamt-Katecholaminen im Herzmuskel zu bieten und dadurch Schlußfolgerungen bezüglich des bei der Extraktion eintretenden Aktivitätsverlustes zu gestatten.

Ergebnisse.

Extrakte aus Modell-Lösungen. Ein Farbverlust trat bei der zum Zweck der biologischen Auswertung durchgeführten Extraktherstellung aus Adrenalin-, Arterenol- oder Adrenalin-Arterenol-Lösungen nicht ein. Dies war vorauszusehen gewesen, da das angewandte Extraktions- und Adsorptionsverfahren mit dem der Shawschen colorimetrischen Methode zugrunde liegenden im wesentlichen identisch ist, wenn auch Adsorption und Elution in anderer Reihenfolge angeordnet sind.

Tabelle 4. *Hundeherzen.*

Hund Nr.	Biologische Bestimmungen in den Herzextrakten					Colorimetrische Bestimmungen (ohne und mit Einbeziehung der biol. Werte)				
	Aktives Adrenalin %*	Aktives Arterenol %*	Aktives Adrenalin γ/g	Aktives Arterenol γ/g	Aktive Gesamtkatecholamine γ/g	Gesamtkatecholamine c. u./g**	Hypothetisches Adrenalin*** γ/g	Hypothetisches Arterenol*** γ/g	Hypothetische Gesamtkatecholamine*** γ/g	Berechnete Aktivität %****
1	9	91	—	—	—	—	—	—	—	—
2	4	96	—	—	—	—	—	—	—	—
3	6	94	—	—	—	—	—	—	—	—
4	5	95	—	—	—	—	—	—	—	—
5	0	100	—	—	—	1100	0	4,9	4,9	—
6	1	99	—	—	—	1788	0,1	7,4	7,5	—
7	1	99	—	—	—	2335	0,1	9,9	10,0	—
8	13	87	—	—	—	2450	0,9	6,5	7,4	—
9	13	87	—	—	—	2625	1,0	7,0	8,0	—
10	27	73	—	—	—	1733	1,1	2,9	4,0	—
11	75	25	—	—	—	2012	1,9	0,6	2,5	—
12	4	96	—	—	—	2555	0,4	9,5	9,9	—
13	27	73	—	—	—	1617	1,0	2,7	3,7	—
14	14	86	—	—	—	2040	0,9	5,2	6,1	—
15	24	86	0,03	0,1	0,13	3280	1,8	6,5	8,3	1,5
16	5	95	0,015	0,28	0,3	2060	0,4	7,4	7,8	4
17	2	98	0,006	0,33	0,34	2300	0,1	9,8	9,9	3
18	26	74	0,007	0,02	0,03	880	0,5	1,5	2,1	1,4
19	28	72	0,023	0,06	0,08	1360	0,9	2,2	3,1	3
20	32	68	0,019	0,04	0,06	1760	1,2	2,5	3,7	1,6
Durchschn.	15	85	0,02	0,14	0,16	1993	0,8	5,3	6,1	2,4

* Prozent der gesamten in den Herzextrakten gefundenen aktiven Katecholamine.

** Colorimetrische Werte der Herzextrakte, in Farbeinheiten (color units) per Gramm Herzmuskel ausgedrückt.

*** Unter Zugrundelegung der colorimetrischen und biologischen Testwerte berechnete hypothetische Menge pro Gramm lebenden Herzmuskels vorhandenen Adrenalins, Arterenols und ihrer Summe.

**** Aktivitätsgrad der Extrakte in Prozenten der hypothetischen Gesamtaktivität im lebenden Herzen.

Ganz anders verhielt es sich mit der pharmakodynamischen Aktivität der aus Modell-Lösungen hergestellten Extrakte. Diese ist auch von GOODALL[20] für Arterenol (aber anscheinend nicht für Adrenalin) untersucht worden. Er gibt einen Aktivitätsverlust von 15—20% an. Bei HOLTZ[25] finden sich keine diesbezüglichen Angaben, doch heißt es in einem von ihm an den Verfasser gerichteten Schreiben: „Die Verluste an wirksamen Brenzkatechinen sind bei der Adsorption an Aluminium leider sehr groß, mindestens 25%." Obwohl wir uns genau an die von GOODALL[20] und HOLTZ[25] beschriebene Technik hielten, fanden wir die Aktivitätsverluste in der Regel noch weitaus größer. Adrenalin- und Arterenol-Modell-Extrakte, welche ein berechnetes Quantum von je 10 γ/cm^3 hätten enthalten sollen, zeigten eine im Falle des Adrenalins um 60—91%, in dem des Arterenols um 40—92% verminderte Aktivität. Adrenalin-Arterenol-Gemische (1:4 bzw. 4:1), auf eine errechnete Extraktkonzentration von 20 γ/cm^3 gebracht, ergaben sogar Adrenalin-Aktivitäts-Verluste von 91—100% und Arterenol-Aktivitäts-Verluste von 78—96%. Die Größe und Unregelmäßigkeit dieser Aktivitätsverluste würde ernstliche Zweifel an der Verwendbarkeit der in Frage stehenden Extraktionsmethode rechtfertigen, wenn es nicht eine bekannte Tatsache wäre, daß chemisch reines Adrenalin weitaus labiler und zerstörbarer ist als aus biologischem Material stammendes (durch Begleitstoffe geschütztes?). Letzeres ergab sich auch aus den weiter unten besprochenen Versuchen mit lebenden Hunden injiziertem Adrenalin und Arterenol, bei deren Extraktion ein bedeutend geringerer Aktivitätsverlust festzustellen war.

Tabelle 5. *In Herzextrakten verschiedener Tierspezies von anderen Autoren mittels biologischer Methodik gefundenes aktives Adrenalin und Arterenol.*

Spezies	Adrenalin %	Arterenol %	Adrenalin γ/g	Arterenol γ/g	Autor
Rind	7—23	77—93	0,02—0,045	0,15—0,26	HOLTZ u. Mitarb.[25]
Rind	7—26	74—93	0,015—0,087	0,14—0,39	GOODALL[20]
Schwein	8—23	77—92	0,029—0,105	0,293—0,487	HOLTZ u. Mitarb.[25]
Kaninch.	8—35	65—92	0,045—0,094	0,168—0,544	HOLTZ u. Mitarb.[25]
Schaf	16	84	0,15	0,79	GOODALL[20]
Meerschwein.	15—35	67—85	0,18—0,221	0,433—1,052	HOLTZ u. Mitarb.[25]
Ratte	6	94	0,044	0,72	GOODALL[20]

Extrakte aus normalen Hundeherzen. Wie Tab. 4 und 5 zeigen, stimmen unsere Ergebnisse betreffend das gegenseitige Mengenverhältnis von Adrenalin und Arterenol im Herzen mit den von HOLTZ[25] und GOODALL[20] veröffentlichten insofern gut überein, als bei 19 unter 20 Herzen anscheinend gesunder Hunde der Adrenalin-Prozentgehalt zwischen 0 und 32% der gesamten aktiven Extrakt-Katecholamine lag. In einem Fall

allerdings betrug der Adrenalinwert 75%, ein Befund, wie er an pathologischen Menschenherzen verhältnismäßig häufig erhoben wurde (siehe unten).

Die in 6 Hundeherzen bestimmten absoluten Aktivitätswerte für Adrenalin und Arterenol lagen zum Teil etwas niedriger als die von Goodall[20] und Holtz[25] für die Herzen verschiedener anderer Spezies angegebene Variationsbreite (Tab. 5). Das Mißverhältnis zwischen den mittels der Shawschen Methode gewonnenen colorimetrischen Gesamtkatecholwerten und den biologischen Testresultaten erschien noch größer als bei den oben erwähnten Modell-Lösungen von Adrenalin und Arterenol. Es ergab eine auf Basis der colorimetrischen und biologischen Bestimmungen errechnete Aktivität von nur 1,4—4%.

Es erhebt sich nun die Frage, ob die Parallelität der großen Aktivitätsverluste bei der Extraktion der Modell-Lösungen und der Herzen den Schluß gestattet, daß die im Herzmuskel gefundenen colorimetrischen Werte ebenfalls (wie die der Modell-Lösungen) zur Gänze oder fast zur Gänze aktives Adrenalin und Arterenol repräsentieren. Diese Frage kann nicht ohne weiteres bejaht werden. Goodall[20], der beim Vergleich der biologischen Aktivität seiner Schafherz-Extrakte mit deren colorimetrischen Werten (Methode von v. Euler u. Hamberg[14]) ähnlich wie wir nur 12% Aktivität konstatierte, vermutet in den Extrakten eine Beteiligung pharmakodynamisch inaktiver chromogener Stoffe. Ob letztere im Herzen vorgebildet sind oder erst während der Extraktion durch Inaktivierung von Adrenalin und Arterenol entstehen, wie bei den Modell-Lösungen, entzieht sich vorläufig der Beurteilung. Eine besonders gute Übereinstimmung zwischen colorimetrischen (Methode von Folin, Cannon u. Denis[15], Eisenchloridmethode) und biologischen Werten wurde anscheinend von v. Euler erhalten, nach dessen kurzer Mitteilung[10] die gefundene Aktivität einem Quantum von 5 γ Adrenalin per Gramm Herzmuskel entsprach und demnach weit oberhalb aller von Goodall, Holtz und uns biologisch ermittelter Werte lag. Diese ergaben nur in seltenen Ausnahmefällen eine aktive Gesamtkatecholaminmenge von 1 γ per Gramm Herzmuskel.

Extrakte aus Hundeherzen nach Injektion von Adrenalin und Arterenol. Nach intraperitonealer oder intravenöser Injektion von Adrenalin oder Arterenol oder von beiden zugleich und nach Entnahme des Herzens der innerhalb von 10—25 min getöteten oder spontan eingegangenen Tiere zeigten die Herzextrakte, wie dies schon früher von dem einen von uns[42] dargetan worden war, außerordentlich hohe colorimetrische Werte (Tab. 6). Die biologische Testung ergab nach Adrenalininjektion einen abnorm hohen relativen Adrenalingehalt (40—100% an Stelle der gewöhnlichen 0—27%), während nach Arterenolinjektion der Prozentgehalt des letzteren 99—100% betrug.

In 2 Fällen wurden Adrenalin und Arterenol gleichzeitig (im Verhältnis 2:1) injiziert (Tab. 6, Nr. 28 und 29). Wiederum waren die colorimetrischen Ablesungen hoch. Die biologisch gefundenen Adrenalin-Arterenol-Mengen verhielten sich im Versuch Nr. 28 wie 2:1, im Versuch Nr. 29 aber wie 100:0. Das Verschwinden des Arterenols in letzterem Fall blieb unaufgeklärt.

Hervorzuheben ist die relativ hohe Aktivitätsausbeute aus den Herzextrakten mit Adrenalin oder Arterenol injizierter Tiere. Während die Aktivität bei den Kontrollhunden höchstens 4% (im Durchschnitt 2,7%) der „hypothetischen Gesamtkatecholamine" ausmachte, war sie bei den injizierten Tieren 17—77% (durchschnittlich 35%). Subtrahiert man von

Tabelle 6. *Hundeherzen nach Injektion von Adrenalin oder/und Arterenol.*

Hund Nr.	Injizierte Substanz	Dosis (Gamma per g)	Tod nach min	Biologische Bestimmungen in den Herzextrakten					Colorimetrische Bestimmungen (ohne und mit Einbeziehung der biol. Werte)				Berechnete Aktivität %****
				Aktives Adrenalin %*	Aktives Arterenol %*	Aktives Adrenalin γ/g	Aktives Arterenol γ/g	Aktive Gesamtkatecholamine γ/g	Gesamtkatecholamine c. u. /g**	Hypothetisches Adrenalin*** γ/g	Hypothetisches Arterenol*** γ/g	Hypothetische Gesamtkatecholamine*** γ/g	
21	Adrenalin	7,5	8	100	0	2,1	0	2,1	6000	6,0	0	6,0	35
22	Adrenalin	7,5	10	40	60	1,4	2,1	3,5	7440	5,5	8,3	13,8	25
23	Adrenalin	7,5	10	55	45	3,1	2,9	6,0	7420	6,3	5,1	11,4	51
24	Adrenalin	10	10	66	34	0,9	0,5	1,4	6200	5,6	2,6	8,2	17
25	Adrenalin	10	10	100	0	4,4	0	4,4	5660	5,7	0	5,7	77
26	Arterenol	10	10	0	100	0	2,5	2,5	3700	0	16,3	16,3	15
27	Arterenol	10	10	1	99	0,05	4,6	4,7	2800	0,12	11,8	11,9	39
28	Adrenalin + Arterenol	7,5 / 3,8	10	67	33	1,9	0,9	2,8	7500	6,7	3,3	10,0	28
29	Adrenalin + Arterenol	7,5 / 3,8	25	100	0	2,1	0	2,1	7205	7,2	0	7,2	29

* Prozent der gesamten in den Herzextrakten gefundenen aktiven Katecholamine.

** Colorimetrische Werte der Herzextrakte, in Farbeinheiten (color units) per Gramm ausgedrückt.

*** Unter Zugrundelegung der colorimetrischen und biologischen Testwerte berechnete hypothetische Menge pro Gramm lebenden Herzmuskels vorhandenen Adrenalins, Arterenols und ihrer Summe.

**** Aktivitätsgrad der Extrakte in Prozenten der hypothetischen Gesamtaktivität im lebenden Herzen.

den Colorimetriewerten adrenalin- oder arterenolbehandelter Tiere den colorimetrischen Gegenwert der in den Extrakten erhaltenen aktiven Adrenalin- und Arterenolmengen (1000 Farbeinheiten [c. u.] per Gamma Adrenalin, 227 c. u. per Gamma Arterenol) (Tab. 7), so verbleibt mitunter überhaupt kein Rest (Versuche Nr. 25, 27). Aus den in Tab. 7 angegebenen Daten geht hervor, daß injizierte und in den Herzmuskel aufgenommene Katecholamine eine weitaus höhere (mitunter anscheinend 100%ige) Aktivitätsausbeute gewähren als die im normalen Herzmuskel colorimetrisch erfaßten Gesamtkatecholamin-Mengen. Die niedrige Aktivitätsausbeute der letzteren (4% oder weniger der „hypothetischen Gesamtkatecholamine") macht es unwahrscheinlich, daß die chromogenen Katecholamine des normalen Herzmuskels gänzlich aus aktivem Adrenalin und Arterenol bestehen. Wenn solche aktive Katecholamine auch wahrscheinlich in größerer Menge im Herzmuskel enthalten sind als es die biologischen Testwerte anzeigen, so muß doch damit gerechnet werden, daß das Myokardium darüber hinaus ein gewisses Quantum „inaktiver" chromogener Extrakatecholamine enthält.

Tabelle 7. *Differenzen zwischen den colorimetrischen Gesamtkatecholamin-Werten mit Adrenalin und Arterenol injizierter Hunde, den Farbwerten der biologisch nachgewiesenen Adrenalin- und Arterenol-Überschüsse und denen der restlichen inaktiven Katecholamin-Überschüsse.*

	A	B	C	D
Hund Nr.	Gesamt-katecholamine (colorimetr.) c. u./g	Berechneter Farbwert der in den Extrakten biologisch nachgewiesenen Katecholamine c. u./g	A—B c. u./g	Geschätzter Farbwert der *inaktiven* Katecholaminüberschüsse in den Extrakten (C minus durchschnittlicher normaler Gesamtkatecholamin-Farbwert*) c. u./g
21	6000	2100	3900	1907
22	7440	1877	5563	3570
23	7420	3758	3662	1669
24	6200	1014	5186	3193
25	5660	4400	1260	—
26	3700	568	3132	1139
27	2800	1094	1706	—
28	7500	2104	5396	3403
29	7205	2100	5105	3112

* Der durchschnittliche normale Gesamtkatecholamin-Farbwert von 17 Hundeherzen betrug 1993 c. u./g.

Der Ausdruck „inaktiv" ist in dem Sinne zu verstehen, daß die betreffenden Stoffe weder den Blutdruck der Katze erhöhen noch das Rectal-Coecum des Huhnes zur Erschlaffung bringen. Daß sie Katecholamincharakter besitzen ergibt sich aus ihrer Chromogenizität und spezifischen Adsorbierbarkeit. Ihre biologischen Eigenschaften müßten erst näher untersucht werden, vor allem betreffend die Frage, ob

sie dem Adrenalin ähnliche oxydationssteigernde Wirkungen ausüben, was hinsichtlich ihrer eventuellen pathogenen Bedeutung von Wichtigkeit wäre. Für die Oxydationswirkung scheint das Vorhandensein des Katecholkernes (Benzolring mit 2 freien Hydroxylgruppen in Orthostellung) ausschlaggebend zu sein[3], denn selbst reines Pyrokatechol ist in ähnlicher Weise oxydationssteigernd gefunden worden wie Adrenalin[4, 9, 26] und erzeugte am Elektrokardiogramm des Kaninchens „anoxische" Veränderungen (Abflachung bzw. Umkehr der T-Zacke[41]). Es ist also wahrscheinlich, daß die colorimetrisch erfaßten, jedoch an den pharmakodynamischen Aktivitäts-Tests nicht teilnehmenden Katecholamine des Säugetierherzens als Mitregulatoren des oxydativen Myokardstoffwechsels neben dem myokardialen Adrenalin und Arterenol eine Rolle spielen dürften.

Extrakte aus Menschenherzen. Die Colorimetriewerte der Gesamtkatecholamine von 21 „normalen" Menschenherzen (d. h. Herzen von Personen, die keine klinischen und pathologisch-anatomischen Anzeichen einer Erkrankung des Herzmuskels aufgewiesen hatten) sind vor mehreren Jahren von dem einen von uns[36] als 275—1123 c. u./g mit einem Durchschnittswert von 698 c. u./g angegeben worden. Aus bisher nicht aufgeklärten Gründen (Verschiedenheiten in den Reagenzien?) wurden in einer neuen Serie von 26 „normalen" menschlichen Herzen die Colorimetriewerte bedeutend höher gefunden, nämlich zwischen 784 und 3120 c. u./g mit einem Durchschnittswert von 1591 c. u./g.

Der perzentuelle Anteil von Adrenalin an den pharmakodynamisch aktiven Katecholaminen der Extrakte betrug bei unseren 26 Normalherzen 0 –50%, im Durchschnitt 15%; bei 7 von Holtz[25] untersuchten menschlichen Herzen machte er 11—60%, im Durchschnitt 37% aus. Da wir in 12 von 14 pathologischen Herzen einen Adrenalin-Prozentgehalt von mehr als 30% gefunden haben (in einem solchen Fall sogar 100%!) und da in der von Holtz[25] veröffentlichten Serie keine Angaben über Normalität oder Abnormalität der Herzen gemacht sind, darf vielleicht angenommen werden, daß seine höheren Adrenalinwerte auf der Teilnahme pathologischer Herzen an seiner Serie beruhen. Die von uns an 10 Herzen pro Gramm Herzmuskel bestimmten absoluten Normalwerte für aktives Adrenalin liegen zwischen 0,002 und 0,037 Gamma (im Durchschnitt 0,016 Gamma), für aktives Arterenol zwischen 0,02 und 0,965 Gamma (im Durchschnitt 0,071 Gamma). Diese Werte entsprechen einem Quantum von „aktiven Extrakt-Katecholaminen", welches nur 0,2—13% (im Durchschnitt 3,7%) der auf colorimetrisch-biologischer Basis berechneten „hypothetischen" Gesamt-Katecholamine ausmacht, ähnlich wie es bei den Hundeherzen der Fall war.

Als möglicherweise bedeutsam sei der Ausnahmefall eines Menschenherzen hervorgehoben, welches die außergewöhnlich hohe Aktivitätsausbeute von 13% bei einem normalen Colorimetriewert von 1760 c. u./g ergab. Es handelte sich um einen Unfall, bei dem durch einen Gewehrschuß, der den li. Ventrikel zerriß, der Tod sofort eintrat. Die relativ hohe Aktivität des aus diesem Herzen gewonnenen Extraktes läßt daran denken, daß die Plötzlichkeit des Todes eine bei anderen langsameren Todesarten vielleicht stattfindende enzymatische intramyokardiale Inaktivierung eines Teiles der Katecholamine verhindert haben könnte.

Besprechung.

Aus den oben angeführten Angaben der Literatur und eigenen Beobachtungen ergeben sich folgende Punkte:

1. *Es existiert derzeit keine ideale Methode zur quantitativen und qualitativen Bestimmung aller im Myokardium enthaltenen Katecholamine.* Die colorimetrische Methode von Shaw[53] schließt neben Adrenalin und Arterenol (außer der farbschwachen Ascorbinsäure) anscheinend auch noch andere chromogene Katecholamine ein. Die pharmakodynamische Prüfung von Herzextrakten am Katzenblutdruck und am Rectal-Coecum des Huhnes nach v. Euler[11, 12, 13], Goodall[20] und Holtz[25] gestattet zwar eine Beurteilung des relativen gegenseitigen Mengenverhältnisses von Adrenalin und Arterenol in den Extrakten, gibt aber infolge der anscheinend großen und unregelmäßigen Aktivitätsverluste, welche während des Extraktionsprozesses eintreten, keinen verläßlichen Aufschluß über die absolute Menge im lebenden Herzmuskel vorhandenen pharmakodynamisch aktiven Materiales.

2. Die bisherigen Angaben über das *Überwiegen von Arterenol über Adrenalin*[11, 12, 13, 20, 25] werden für das Herz des Hundes und des (nicht herzkranken) Menschen bestätigt.

3. *Injiziertes Adrenalin und Arterenol häufen sich im Herzmuskel rasch in verhältnismäßig großen Mengen an*, was sich in einer Erhöhung sowohl der colorimetrischen als der pharmakodynamischen Testwerte kundgibt. Der durch den Adsorptionsprozeß hervorgerufene Aktivitätsverlust injizierten Adrenalins und Arterenols, welches aus dem Herzen wiedergewonnen wurde, war wesentlich geringer als der Aktivitätsverlust aus manchen synthetischen Modell-Lösungen isolierten Adrenalins und Arterenols. Diese höhere Resistenz aus Gewebe extrahierten Adrenalins und Arterenols sowie die große Diskrepanz zwischen den colorimetrischen Gesamtkatecholamin-Werten und der pharmakodynamisch feststellbaren Adrenalin-Arterenol-Aktivität der normalen Herzextrakte scheint darauf hinzuweisen, daß außer diesen beiden sympathomimetischen Substanzen auch noch andere chromogene, aber pharmakodynamisch nicht aktive Katecholamine im Herzmuskel vorhanden sind.

4. Der colorimetrisch bestimmte *Gesamtkatecholamingehalt normaler menschlicher Herzen* ähnelt dem anderer Säuger-Spezies. Abnorm hohe Werte wurden in Fällen von plötzlichem „funktionellem" Herztod[38, 39], von Urämie[41, 42, 45] und von Herzinsuffizienz und Angina pectoris gefunden[36, 45]. Auch der *relative*, aus der pharmakodynamischen Testung der Herzextrakte errechnete *Adrenalingehalt* (verglichen mit dem Arterenolgehalt) erwies sich *in pathologischen Herzen* (Hypertrophie, Insuffizienz, Myokardinfarkt, „funktioneller" Herztod) als oft *stark über die Norm erhöht*[45], was von pathogenetischer Bedeutung sein dürfte, weil die oxydationssteigernde, sauerstoffverschwendende und dadurch wahrscheinlich myokardhypoxie-erzeugende Wirkung des Adrenalins die des Arterenols bei weitem übertrifft[24, 28, 33].

Die pathogenetische Rolle der pharmakodynamisch inaktiven, aber wahrscheinlich ebenfalls oxydationssteigernden, mit Adrenalin und Arterenol nicht identischen Extra-Katecholamine des Herzmuskels und ihre Entstehungsweise müssen erst näher untersucht werden.

Zusammenfassung.

Die Gesamtkatecholamine des Säuger- und Menschenherzens setzen sich zusammen aus a) Arterenol, welches normalerweise die Hauptmenge der pharmakodynamisch aktiven sympathomimetischen Katecholamine im Herzmuskel ausmacht; b) Adrenalin, welches in geringeren Mengen vorhanden ist; c) pharmakodynamisch relativ inaktiven „Extra-Katecholaminen" (Dioxyphenylalanin? Oxytyramin? N-Alkylamine des Noradrenalins? Adrenalinogen?), die jedoch in ähnlicher Weise wie Adrenalin auf den oxydativen Myokardstoffwechsel stimulierend einwirken dürften.

Mittels *pharmakodynamischer Testverfahren* läßt sich das gegenseitige Mengenverhältnis von Adrenalin und Arterenol, nicht aber deren absolute Konzentration im Herzmuskel bestimmen. Die Gesamtkatecholamine sind *colorimetrisch* erfaßbar, doch beeinträchtigt die ungleiche Färbekraft der beteiligten Komponenten die quantitative Deutbarkeit der Ablesungen.

Die *Gesamtmenge der Herz-Katecholamine* ist nach Injektion von Adrenalin und Arterenol stark erhöht. Sie *hängt ferner ab von der sympathischen Neurosekretionstätigkeit und Nebennierenmarksekretion*, z. B. Vermehrung bei elektrischer Sympathicusreizung, Muskelarbeit, Kälteeinwirkung, Vitamin B_1-Mangel usw.; dagegen Verminderung nach Adrenalektomie und Sympathektomie.

In *pathologischen menschlichen Herzen* wurden teils abnorm hohe Gesamtkatecholamin-Mengen, teils ein abnorm gesteigerter relativer Adrenalingehalt festgestellt. Die sauerstoffverschwendende, hypoxie-erzeugende Eigenschaft der Katecholamine, vor allem des Adrenalins, läßt diese Substanzen als kardiotoxische Faktoren ersten Ranges in der Pathogenese verschiedener „funktioneller" und „degenerativer" Herzkrankheiten erscheinen.

Literatur.

[1] Bacq, Z. M.: Arch. internat. Physiol. **36**, 167, 222 (1933). — [2] Bacq, Z. M., et P. Fischer: Arch. internat. Physiol. **55**, 73 (1947). — [3] Ball, E. G., and T. T. Chen: J. of Biol. Chem. **102**, 691 (1933). — [4] Blix, G.: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **56**, 131 (1929). — [5] Busacchi, P.: Arch. ital. Anat. **11**, 352 (1912). — [6] Cannon, W. B., and K. Lissák: Amer. J. Physiol. **125**, 765 (1939). — [7] Demoor, J.: Soc. roy. de sci. méd. et nat. de Bruxelles; vol. jubil. Brux., 571 (1922). — [8] Eckstein, R. W., M. Stroud, R. Eckel, C. V. Dowling and W. H. Pritchard: Amer. J. Physiol. **163**, 539 (1950). — [9] Edlbacher, S., u. J. Kraus: Z. physiol. Chem. **178**, 239 (1928). — [10] v. Euler, U. S.: J. of Physiol. **105**, 38 (1946). —

[11] v. Euler, U. S.: Arch. internat. Pharmacodynamie **77**, 477 (1948). — [12] v. Euler, U. S.: Nature (Lond.) **162**, 570 (1948). — [13] v. Euler, U. S.: Festschrift f. Prof. Dr. E. Rothlin, S. 129. Basel: Schwabe 1948/49. — [14] v. Euler, U. S., u. U. Hamberg: Acta physiol. scand. **19**, 74 (1949). — [15] Folin, O., W. B. Cannon and W. Denis: J. of Biol. Chem. **13**, 477 (1912). — [16] Gaddum, J. H., u. M. A. Khayyal: Unveröffentlichte Versuche, zit. bei Gaddum in: Gefäßerweiternde Stoffe der Gewebe. Leipzig: Thieme 1936. — [17] García-Ramos, J. G., u. J. R. de Arellano: Arch. del Inst. de Cardiol. de Mexico **21**, 205 (1951). — [18] Gollwitzer-Meier, K., K. Kramer u. E. Krüger: Pflügers Arch. **237**, 639 (1936). — [19] Gollwitzer-Meier, K., u. C. Kroetz: Klin. Wschr. **19**, 580, 616 (1940). — [20] Goodall, Mc C.: Acta physiol. scand. **24** (suppl. 85) (1951). — [21] Haberlandt, L.: Z. Biol. **82**, 536 (1924/25). — [22] Haberlandt, L.: Wien. med. Wschr. Nr. 16/17 (1931). — [23] Hoffmann, F., E. J. Hoffmann, S. Middleton and J. Talesnik: Amer. J. Physiol. **144**, 189 (1945). — [24] Holtz, P.: Klin. Wschr. **28**, 145 (1950). — [25] Holtz, P., J. Kroneberg u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 551 (1951). — [26] Kisch, B.: Exp. Med. (New York) **5**, 166 (1947). — [27] Konzett, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **197**, 41 (1940). — [28] Kroneberg, G.; zit. bei Holtz: Schweiz. med. Wschr. **78**, 252 (1948). — [29] Lands, A. M., V. L. Nash, H. M. McCarthy, H. R. Granger and B. L. Dertinger: J. of Pharmacol. **90**, 110 (1947). — [30] Lehmann, G., u. H. Kinzius: Pflügers Arch. **253**, 132 (1951). — [31] Loewi, O.: Pflügers Arch. **189**, 239 (1921). — [32] Loewi, O.: Pflügers Arch. **237**, 504 (1936). — [33] Lundholm, L.: Acta physiol. scand. **21**, 195 (1950). — [34] Outschoorn, A. S., and M. Vogt: Brit. J. Pharmacol. **7**, 319 (1952). — [35] Raab, W.: Endocrinology **29**, 564 (1941). — [36] Raab, W.: Exp. Med. (New York) **1**, 188 (1943). — [37] Raab, W.: Biochemic. J. **37**, 470 (1943). — [38] Raab, W.: Arch. of Path. **36**, 388 (1943). — [39] Raab, W.: Arch. of Path. **38**, 110 (1944). — [40] Raab, W.: J. of Pharmacol. **82**, 330 (1944). — [41] Raab, W.: J. Labor. a. Clin. Med. **29**, 715 (1944). — [42] Raab, W.: Arch. Kreislaufforschg. **15**, 39 (1949). — [43] Raab, W.: Hormonal and Neurogenic Cardiovascular Disorders. Baltimore: Williams & Wilkins 1953. — [44] Raab, W.: Unveröffentlichte Beobachtungen. — [45] Raab, W., u. W. Gigee: Unveröffentlichte Beobachtungen. — [46] Raab, W., and R. J. Humphreys: J. of Pharmacol. **89**, 64 (1947). — [47] Raab, W., and R. J. Humphreys: Amer. J. Physiol. **148**, 460 (1947). [48] Raab, W., and E. Lepeschkin: Circulation **1**, 741 (1950). — [49] Raab, W., and E. Lepeschkin: Cardiologia **16**, 332 (1950). — [50] Raab, W., and J. P. Maes: Amer. J. Physiol. **148**, 470 (1947). — [51] Raab, W., and G. C. Supplee: Exper. Med. (New York) **2**, 152 (1944). — [52] Schimert, G.: Z. klin. Med. **145**, 1 (1949). — [53] Shaw, F. H.: Biochemic. J. **32**, 19 (1938). — [54] Trinci, G.: Mem. R. Acad. Sci. de Bologna, 4, Ser. 6 (1907). — [55] Verly, W.: Arch. internat. Physiol. **55**, 397 (1948). — [56] Wiesel, J.: Wien. klin. Wschr. **24**, 723 (1906).

Prof. Dr. W. Raab, University of Vermont, College of Medicine, Burlington, Vermont/USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 263—272 (1953).

Department of Pharmacology, Georgetown University Medical and Dental School, Washington 7, D. C.

Central Effects of Diisopropyl-fluorophosphonate (D. F. P.) in Urodele Larvae*.

By

Alexander G. Karczmar and Theodore Koppanyi.

With 2 figures in the text.

(Eingegangen am 23. März 1953.)

Introduction.

We have shown previously that the effects of pharmacological agents on the "overt behaviour"[10] of larval salamanders differ from one developmental stage to the other[13, 15, 18]. By recognizing "a correlation between developing structures and their capacity to function"[10] and extending this correlation to the drug effect, a method was proposed[13, 15, 19, 20] for studying the site and the mechanism of action of pharmacological agents. This approach is particularly fruitful when combined with enzymatic studies[32, 34, 35, 36].

The application of this method to the problem of the site and mechanism of certain toxic actions of anticholinesterase drugs, and to the controversial problem of central antidotal action of atropine, affirmed by some workers[5, 30] and denied by others[9], is the subject of this paper.

Methods.

Clusters of eggs of the urodele, Amblystoma punctatum, containing from 50 to 150 ova, were collected in early spring in the vicinity of Washington, D. C. The eggs, and subsequently the larvae, were kept in spring water at 20 ± 0.5° C. The developmental stage was determined according to the unpublished morphological tables of Harrison, and to stages of Glücksohn[6]. The physiological stages of development of motor behaviour of Coghill[3], and measurements of embryonic and larval lengths were also employed.

One series of experiments was carried out, as far as possible, on embryos obtained from a single egg-cluster; the drug effects were studied during the larval development, beginning with Harrison's stage 8 and ending with stage 44—45. It takes, at 20° C, about two weeks for embryos of stage 8 to advance to stage 44—45. Stage 8 specimens were advanced blastulae, 6—8 mm long. The first motility, which is a slow flexure[3], appears at stage 34. This is an advanced neurula, 10—12 mm long, with gills, balancers and forelimb rudiments. Embryos of these

* On behalf of the Medical Faculty of Georgetown University in general, and of the Department of Pharmacology in particular, I am very happy to wish Prof. Otto Loewi a happy birthday and many fruitful years of research. Dr. Karczmar and I dedicate this modest contribution to Prof. Loewi, as we have dedicated past contributions on acetylcholine to this great pioneer of chemical mediation of nerve impulses. T. K.

early stages do not hatch spontaneously, and when experimented upon they had to be carefully freed from their vitelline membranes. Early progressive swimming appears at Harrison's stage 37—38[35,3]. The oldest larvae of this experimental series, Harrison's stage 44—45, were 15—16 mm long, had forelimbs with three digits and a fourth digit rudiment, but no hindlimbs.

Another series of experiments was carried out on free swimming larvae, 22 to 26 mm long, Glücksohn's stage 60. These larvae had forelimbs with four digits, and hindlimb buds with fifth toe rudiments. All larvae of this series and the free-feeding larvae of the earlier series were fed three times a week with Tubifex and Enchytraeus worms.

All drugs studied were either water-soluble, or, if alkaloids, used as water-soluble salts (see Table 1). Thus, larvae could be reared or kept for any desired time period in drug solutions. The solutions were freshly prepared immediately prior to the experiments; in case of diisopropyl fluorophosphonate (D.F.P.) the desired solutions were prepared from a 2 per cent stock solution of D.F.P. in propylene glycol. In case of chronic experiments, solutions were changed daily.

For determination of cholinesterase activity, whole larvae were repeatedly rinsed, homogenised in Potter's homogenisers in 0·03 M bicarbonate, dilution 1:50, and assayed for the enzyme activity manometrically[1]. Since acetyl-β-methylcholine (methacholine, initial concentration 0.03 M) was used as the substrate, the data yield activity of acetylcholinesterase ("true" cholinesterase) exclusively[2].

Results.

Effects of D.F.P. on embryos and younger larvae.

This series of experiments deals with 120 A. punctatum larvae, Harrison's stages 8 to 44—45, exposed to D.F.P. in concentrations from 10^{-6} to 10^{-10} M. The exposure was either continuous throughout this developmental period, or embryos were placed in D.F.P. solutions intermittently.

In the continuous exposure experiments a small percentage of embryos exogastrulated in 10^{-10} M solutions. Solutions of 10^{-9} M proved lethal within 8 days, i.e., when the embryos reached stage 28 to 29 (premotile). Stronger concentrations caused death sooner.

When older embryos (such as stage 26 larvae) were placed in 10^{-10} M or stronger D.F.P. solutions they could survive the exposure till at least the first motile developmental stage (Harrison's stage 34). In such cases, the "overt behaviour" was affected. Thus, stage 36 larvae, normally capable of flexure and coil-reaction to stimulation[3], relaxed flexure or coil slowly, thus exhibiting a tetanic tendency. Myo-clonic and myo-tonic convulsions appeared at about stage 40+, and will be described in the next section. Also shorter exposure to D.F.P., 10^{-5} to 10^{-7} M, affected the "overt behaviour" of embryos in stages 36 to 45. However, some latent period was always observed (see next section).

These data agree with those of Sawyer[35] on responses of Amblystoma larvae to eserine. Moreover, stage 34 during which larval "overt behaviour" was first influenced by eserine[35] and D.F.P., is the stage of appearance of cholinesterase[35]. However, non-motile embryos which

do not as yet show cholinesterase activity[35] are killed by concentrations of D.F.P. capable, at later developmental stages, of changing larval "overt behaviour", and of causing convulsions.

Effects of D.F.P on older Amblystoma larvae. Six groups of larvae, GLÜCKSOHN's stage 60, were exposed to D.F.P. solutions, concentrations 10^{-10} to 10^{-5} M (Table fig. 1). No significant effect was noted with solutions of 10^{-10} M. With stronger solutions, an effect on the "overt

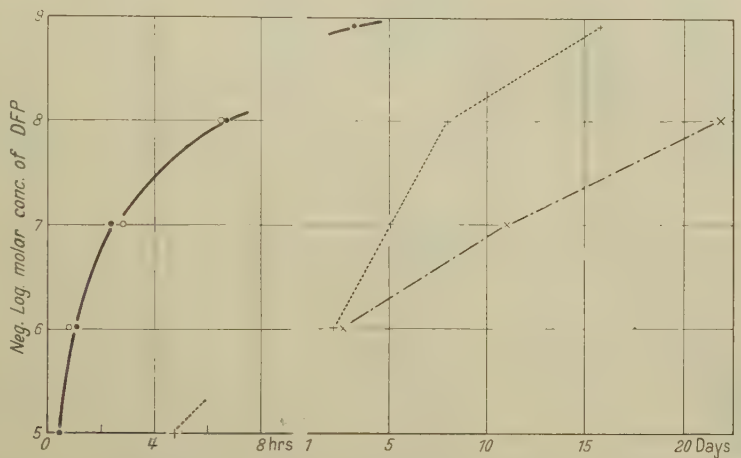


Fig. 1. Latent period and toxicity of action of various concentrations of D.F.P. on Amblystoma, stage 60 (GLÜCKSOHN) larvae. Full circles, continuous line: latent period of D.F.P. effects on larval "overt behaviour". Empty circles and continuous line: latent period of larvae kept in D.F.P. and atropine (10^{-8} or 10^{-9} M) solutions (see also text). Crosses and dashed line: fatal period of larvae kept in D.F.P. solutions. Stars and interrupted line: fatal period of larvae kept in D.F.P. and atropine (10^{-8} or 10^{-9} M) solutions (see also text). Each point represents an average of results obtained with at least 8 larvae. Ordinate: molar concentration of D.F.P. in negative logarithms; abscissa, two scales: duration of exposure to D.F.P. in hours or days.

behaviour" was observed after a latent period depending on concentration and varying from half-an-hour (10^{-5} M) to several days (10^{-9} M solution, fig. 1). Following this latent period, the larvae which normally exhibit spontaneous motility only rarely, showed, first, increased frequency of swimming periods, then, increased intensity of swimming motion, and ultimately convulsed from time to time spontaneously. On mechanical stimulation, they exhibited first hyperexcitability, then hypermotility, exaggerated swimming motion, tail flutter, myoclonic and finally myo-tonic convulsions (Table fig. 2). Moreover, D.F.P.-treated larvae were much more easily fatigued following stimulation than the controls, till finally a motor response could not be elicited on stimulation. At that time larvae remained mostly quiescent in pleurothotonus, or in a "coil" position. Finally, flaccid paralysis supervened. It is noteworthy, that even in strong (10^{-6} M) D.F.P. concentrations larvae survived up to 2 days (fig. 1), in intermittent tetanus, pleuro-

thotonus or paralysis; in weaker concentrations death may not have occurred until after two weeks of continuous exposure (fig. 1). Thus, survival time of larvae was a function of D.F.P. concentration. In terminal cases continued viability of the completely flaccid and paralyzed larvae could be established only by microscopic observation of cardiac function and gill circulation.

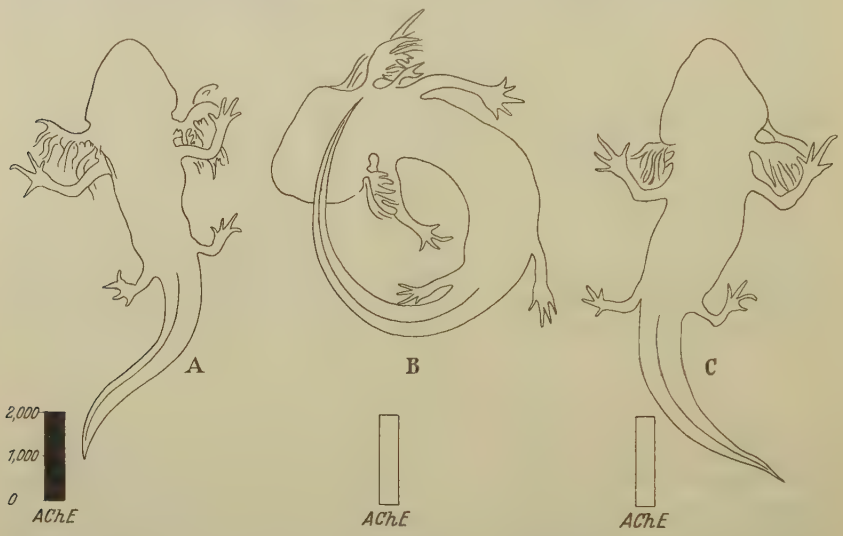


Fig. 2. Effect of D.F.P. on larval "overt behaviour" and acetylcholinesterase (AChE) activity. Top row, Amblystoma stage 60 (Glücksohn) larvae: A, control larva; B, larva kept for 5 days in 10^{-8} M D.F.P. solution; the larva is drawn in typical myo-tonic, tetanic convulsion ("coil" position); C, larva kept for 8 days in spring water, following a 4 day exposure to 10^{-7} M D.F.P. solution. All drawings schematised. Bottom row: AChE activity in mm^3 of CO_2, per 100 mgm. of larval tissues, per 30 min. The AChE activities represent averages, each obtained with at least 6 larvae.

The study of recovery from D.F.P. poisoning was undertaken in another series of experiments (35 cases), in which larvae in various stages of D.F.P. poisoning were transferred to spring water. In almost all cases recovery was relatively rapid and fairly complete. Larvae in myo-clonic or myo-tonic convulsions ceased convulsing, and subsequently fairly normal swimming motions were restored. Even larvae in terminal stages of paralysis showed in majority of cases a relatively rapid recovery; first motility was, for instance, observed on the second day following the transfer to spring water of larvae exposed for one week to a 10^{-9} M concentration of D.F.P. Relatively normal motor activity was observed within a few days (fig. 2).

Finally, an attemt was made to correlate the effects of D.F.P. on larval "overt behaviour" and the recovery from D.F.P. poisoning upon transfer into spring water, with acetylcholinesterase activity. Generally, concentrations of D.F.P. capable of causing convulsions were found to

Table. *Effects of Various drugs on the "Overt Behaviour" of Amblystoma larvae, stage 60* (GLÜCKSOHN).
Molar concentrations. Lethal concentrations refer to acute LD_{100} s.

Drug	Number of Animals	Concentrations		CNS Effect	Remarks
		Minimum effective	Lethal		
D.F.P.	80	10^{-9}	10^{-5}	1. "Tail-twitch" 2. Myo-clonic covulsions 3. Tonic convulsions 4. Paralysis	Latent period depending on concentration
Prostigmine methyl sulfate	40	2×10^{-7}	10^{-5}	Myo-clonic and tonic covulsions. Paralysis.	Latent period depending on concencentration
T.E.P.P.	12	?	10^{-7}	Myo-clonic and tonic convulsions. Paralysis.	
Nicotine salicylate	40	3×10^{-7}	10^{-6}	Inconclusive hyperexcitability with concentration 10^{-7}. No convulsions. Paralysis with 3×10^{-7} solution.	1 day latent period with 3×10^{-7} solution. Some recovery on transfer into Holtfreter.
Atropine sulfate	35	?	3×10^{-7}	?	No typical convulsions. Fatal period depends on concentration.
Strychnine sulfate	30	5×10^{-19}	5×10^{-5}	Myo-clonic and tonic convulsions.	Irreversible paralysis after 1 month (opisthotonus).
Metrazol	40	10^{-4}	10^{-4}	Myo-clonic and weak tonic convulsions.	Latent period of one day. Some reversibility of the CNS effect.
Nikethamide	35	None	5×10^{-5}	No convulsions observed.	Fatigue and paralysis with lethal concentrations.
Strychnine + Atropine	30	10^{-9} $\times10^{-9}$	?	Myo-clonic and tonic convulsions. Paralysis within 72 hours.	Negligible latent period.

inhibit completely acetylcholinesterase activity. Complete inhibition was obtained with 10^{-8} M (6 larvae) and stronger (12 larvae) solutions (fig. 2). These completely inhibitory concentrations of D.F.P. compare favourably with those capable in vitro of 100 per cent inhibition of acetylcholinesterase of mammalian brain and other organs[4, 11]. As already stated, stronger D.F.P. solutions killed the larvae faster, without causing more measurable enzymatic inhibition. The data agree also with earlier results from this laboratory[12, 14] indicating good penetration of various agents in Amblystoma larvae, probably via skin and especially gills.

D.F.P.-poisoned larvae which showed rapid functional recovery upon transfer to spring water exhibited no measurable recovery of acetylcholinesterase activity (9 larvae). This inhibition persisted even after 8 days in daily changed spring water (3 larvae). Although these data agree well with the generally accepted concept of irreversibility of D.F.P. action on cholinesterases, they are surprising in view of the functional recovery of larvae of this group (fig. 2).

Effects of combined D.F.P. and atropine treatment on stage 60 (Glücksohn) *larvae.* Older, free-swimming larvae could be reared indefinitely in 10^{-9} M atropine solutions. Stronger solutions were lethal, the fatal period depending on concentration (3 to 4 weeks in case of 10^{-7} M solution). Shortly before death, brief myo-clonus could be sometimes elicited by stimulation, but typical myo-clonic or myo-tonic convulsions, tetanus or plerothotonus were never observed.

Two types of experiments were carried out to study the effects of atropine on D.F.P. toxicity: (1) larvae were exposed for several hours to 10^{-9} or 10^{-8} M atropine solutions prior to adding D.F.P. in amounts sufficient to make D.F.P. concentration in the solution 10^{-6}, 10^{-7} or 10^{-8} M (50 larvae); or, (2), larvae were exposed to solutions containing both D.F.P. and atropine in concentrations specified above (35 larvae). In either case, the results were similar. Convulsions were never prevented by atropine; actually, larvae convulsed in D.F.P.-atropine solutions after a latent period characteristic for those exposed to D.F.P. along (fig. 1). The character of convulsions was, on the whole, not affected by atropine; in fact, in many cases the tetanic coiling of the larval body seemed particularly noticeable. However, in case of the two weaker concentrations of D.F.P. atropine had considerable life-prolonging effect; this effect was not observed in case of the stronger D.F.P. concentration (fig. 1).

Effects of combined D.F.P. and pentobarbital sodium treatment on stage 60 (Glücksohn) *larvae.* The larval anesthetic concentrations of aliphatic narcotics were established in this laboratory previously[15, 18, 14]. Larvae at this developmental stage are anesthetised by 0.1 per cent pentobarbital sodium in about 45 minutes, and, on transfer to spring

water, recover in about 30 minutes[15, 18]. Weaker effective concentrations (down to 0.02 per cent) cause slower induction and more rapid recovery.

In this series of experiments larvae were either (1) anesthetised in 0.1 to 0.02 per cent pentobarbital solutions prior to adding D.F.P. in amounts sufficient to make D.F.P. concentrations in the solutions 10^{-5} to 10^{-7} M (25 larvae); or, (2) transferred, following pentobarbital anesthesia, into solutions containing D.F.P. alone in concentrations specified (30 larvae). Parenthetically, larvae recovered on transfer to spring water after 2 weeks in even 0.1 per cent pentobarbital solution, while the weakest D.F.P. solution used (10^{-7} M) was lethal in less than a week (fig. 1).

In case of the first group of larvae pentobarbital prevented convulsions for the whole duration of viability of larvae; in the second series of experiments convulsions set in as soon as larvae recovered sufficiently from anesthesia, provided D.F.P. action could manifest itself by that time. Moreover, anticonvulsive concentration of pentobarbital depended on the strength of D.F.P. solution. Thus, in case of 10^{-5} M D.F.P. solution, 0.03 per cent was the weakest anticonvulsant concentration of pentobarbital.

However, in no case did pentobarbital have a life-saving or a life prolonging effect. Thus, death occurred as fast in case of convulsing as in case of pentobarbital-D.F.P. treated larvae, which did not convulse.

Effect of other agents on stage 60 (Glücksohn) *larvae.* Table 1 is self-explanatory with respect to this series of experiments. Let it be stressed, however, that two other anticholinesterases, tetraethylpyrophosphate (T.E.P.P.) and prostigmine, caused convulsions and death similarly to D.F.P. Similar convulsions were caused by central nervous system stimulants with notable exception of nikethamide[13]. In particular, strychnine caused convulsions after a short (1 hour in case of the 10^{-9} M solution) latent period. On the contrary, nicotine did not cause typical convulsions; in stronger solutions, larvae showed hyperexcitability and hypermotility, followed by paralysis.

In the last group of experiments (Table) atropine not only was incapable of preventing or delaying strychnine convulsions, but in many cases it shortened the latent period characteristic for strychnine alone. Let it be repeated in this connection, that atropine may sometimes intensify D.F.P. convulsions in salamander larvae (see above).

Discussion.

Two problems will be emphasized in this discussion: that of (1) the site and mechanism of D.F.P. toxicity; and that of (2) antidotal effects of atropine and pentobarbital on D.F.P.

1. It is generally agreed that D.F.P. toxicity is due partially to its peripheral effects and partially to its central action. In both instances

D.F.P. was thought for a time to be devoid of direct pharmacological action and the phenomena following its administration were solely ascribed to its anticholinesterase properties. Thus, peripheral effects of D.F.P. are due to the protection it affords acetylcholine — known since Loewi's discovery[24] to be liberated by autonomic and motor neuroeffectors — from hydrolysis by cholinesterases[25, 29]; on the other hand, its central effects depend on its inhibition of cholinesterase[31, 37] whose role in central synaptic transmission was early postulated by Nachmansohn[33]. While all these effects of D.F.P. can be, therefore, termed "esterasic" in nature, it was postulated by Heymans[8] and in this laboratory[22, 23] that D.F.P. possesses also "non-cholinesterasic" properties.

Although peripheral action of D.F.P. includes nicotinic effects on the striated muscle[9], in mammals at least the more immediate and more toxic peripheral action is the muscarinic effect on the heart and especially the bronchi[31]. In Amblystoma larvae, respiring through gills and skin, the central effect, leading to convulsions and later paralysis, is more conspicuous, and it may be the cause of death, since circulation does not stop even in completely paralyzed terminal cases. Sawyer[35] showed that eserine convulsions are not arrested by the removal of the central nervous system, and thought accordingly that they are peripheral in nature. That the nicotinic effect of anticholinesterases on striated muscle[9] is a component of their tetanic effect, is now generally conceded; however, the central component cannot be denied today, and is shown for instance by the fact that the central nervous system depressants inhibit, in Amblystoma as well as in higher species[28, 31], the D.F.P. convulsions.

That the mechanism underlying the convulsions depends at least partially on inactivation of cholinesterase is substantiated by the fact that D.F.P. convulsions appear in the course of Amblystoma development at the time of the appearance of cholinesterase, as in the case of eserine convulsions[35]; and by the fact that acetylcholinesterase of the convulsing, D.F.P.-treated larvae is completely inhibited.

However, the following points must be considered: (1) D.F.P. is lethal to pre-motile Amblystoma embryos in concentrations comparable to those which later inactivate cholinesterase of motile larvae. (2) Pre-motile embryos and free-swimming larvae survive equally long in toxic D.F.P. solutions; the survival time of the latter depends on D.F.P. concentration rather than on cholinesterase level: 10^{-5} M solution of D.F.P. does not cause more measurable cholinesterase inhibition than the 10^{-8} M solution (the inhibition being complete in both cases) but is far more lethal (fig. 1). Finally (3), the absence of cholinesterase may be not the only determining factor that leads to abnormal "overt behaviour": D.F.P.-treated, convulsing or paralyzed larvae show functional recovery without a corresponding recovery of cholinesterase activity (fig. 2).

To conclude this section of the discussion, our current data seem to support our earlier[21, 22, 23] suggestion that the effects of anticholinesterase drugs can be divided into "cholinesterasic" and "non-cholinesterasic".

2. Since the first investigation in 1941 of alkyl esters of fluorophosphoric acid as war gases[27], the search of their antidotes became imperative, and atropine and its derivatives, and aliphatic narcotics and $MgSO_4$ were tried early[5, 7, 9, 16].

There is considerable disagreement among the investigators as to the effects of atropine: GILMAN[5] holds that even small doses of atropine inhibit D.F.P. convulsions; larger doses of atropine (3 to 6 mgm.) were found effective by WESCOE and his associates[39], while no anticonvulsive atropine effect was observed by HEYMANS and JACOB[9]. Atropine may have a non-specific anti-convulsive effect: it was found that in very large doses (400 mgm per kgm) it antagonises also strychnine convulsion in the mouse[26]. However, KOPPANYI[17] found that strychnine and atropine (in doses of up to 50 mgm per kgm, i. v.) synergise rather than antagonise each other in dogs and cats (LD_{50}, i. v., of atropine, was found to be about 100 mgm per kgm, o. c.).

Our present data did not reveal anticonvulsant effects of atropine on either strychnine or D.F.P. convulsions.

Without arresting these convulsions, atropine prolongs life of D.F.P.-treated larvae; this agrees with the data of MODELL and KROP[30]. On the contrary, although premedication or treatment with pentobarbital prevents or arrests D.F.P. convulsions, they do not prolong life. In higher species, convulsions may lead to death mainly by fatiguing respiratory center[38]; in salamander larvae convulsions and central paralysis are compatible with life for many days. Since, in Amblystoma larvae central effects of D.F.P. are apparently not antagonized by atropine, and since muscarinic effects of D.F.P. should not be lethal in this form, it is suggested that the life-prolonging effects of atropine may depend on it antagonising some other, possibly "non-cholinesterasic" effects of D.F.P.

Summary.

1. Amblystoma punctatum embryos and larvae were exposed at various developmental stages to D.F.P. concentrations ranging from 10^{-5} to 10^{-10} M.

2. D.F.P. is lethal in concentrations from 10^{-9} M on to pre-motile embryos shown not to contain cholinesterase.

3. D.F.P. causes convulsions, paralysis and death of free-swimming larvae, and, in concentrations known to inhibit acetylcholinesterase ("true" cholinesterase) in vitro, inhibits it also in larvae.

4. The survival time of larvae exposed to D.F.P. depends on D.F.P. concentration rather than on acetylcholinesterase inhibition.

5. There is a considerable degree of functional recovery of D.F.P.-treated larvae upon transfer to spring water, not accompanied by reappearance of acetylcholinesterase.

6. Pentobarbital sodium premedication or treatment prevent or arrest D.F.P. convulsions but do not prolong life.

7. Atropine does not prevent or stop D.F.P. convulsions, but prolongs life of larvae treated with D.F.P. concentrations weaker than 10^{-5} M. Atropine did not prevent strychnine convulsions.

8. These D.F.P. effects on premotile Amblystoma embryos and free-swimming larvae, and on acetylcholinesterase activity of the latter, and the effects of atropine on D.F.P. toxicity, are discussed with special emphasis on possible "cholinesterasic" and "non-cholinesterasic" components of D.F.P. action.

References.

[1] Ammon, R.: Pflügers Arch. **233**, 486 (1933). — [2] Augustinsson, K.-B.: Arch. Biochem. **23**, 111 (1949). — [3] Coghill, G. E.: Anatomy and the problem of behavoir. New York: The Macmillan Co. 1929. — [4] du Bois, K., and G. H. Mangun: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **64**, 137 (1947). — [5] Gilman, A.: Ann. N. Y. Acad. Sc. **47**, 549 (1946). — [6] Glücksohn, S.: Arch. Entw. mechan. **125**, 341 (1931). — [7] Heymans, C.: Expos. Ann. Biochim. Med. **12**, 21 (1951). — [8] Heymans, C.: Arch. internat. Pharmacodynamie **81**, 230 (1950). — [9] Heymans, C., and J. Jacob: Arch. internat. Pharmacodynamie **74**, 233 (1947). — [10] Hooker, D.: The origin of overt behavior, The University of Michigan, Ann Arbor 1944. — [11] Jones, H. W., B. J. Meyer and L. Karel: Fed. Proc. **7**, 231 (1948). — [12] Karczmar, A. G., and G. G. Berg: J. Morph. a. Physiol. **91**, 479 (1952). — [13] Karczmar, A. G., and T. Koppanyi, Anat. Rec. **99**, 64 (1947). — [14] Karczmar, A. G., and T. Koppanyi: Anat. Rec. **101**, 713 (1948). — [15] Karczmar, A. G., and T. Koppanyi: Fed. Proc. **7**, 231 (1948). — [16] Koelle, G. B., and A. Gilman: J. of Pharmacol. **95**, part. II, 166 (1949). — [17] Koppanyi, T.: Proc, Soc. Exper. Biol. a. Med. **40**, 244 (1939). — [18] Koppanyi, T., and A. G. Karczmar: Anat. Rec. **99**, 65 (1947). — [19] Koppanyi, T., and A. G. Karczmar: Fed. Proc. **6**, 346 (1947). — [20] Koppanyi, T., and A. G. Karczmar: Fed. Proc. **7**, 235 (1948). — [21] Koppanyi, T., and A. G. Karczmar: J. of Pharmacol. **101**, 327 (1951). — [22] Koppanyi, T., A. G. Karczmar and T. O. King: Science (Lancaster, Pa.) **106**, 492 (1947). — [23] Koppanyi, T., A. G. Karczmar and T. O. King: Symp. on Milit. Physiol., Dig. Ser. **4**, 271 (1947) — [24] Loewi, O.: Pflügers Arch. **189**, 329 (1921). — [25] Loewi, O., and E. Navratil: Pflügers Arch. **214** (1926). — [26] Longino, F. H., and R. Preston: J. of Pharmacol. **86**, 174 (1946). — [27] McCombie, H., and B. C. Saunders: Nature **157**, 287 (1946). — [28] McNamara, B. P., G. B. Koelle and A. Gilman: J. of Pharmacol. **88**, 27 (1946). — [29] Matthes, K.: J. of Physiol. **70**, 338 (1930). — [30] Modell, W., and S. Krop: J. of Pharmacol. **88**, 34 (1947). — [31] Modell, W., S. Krop, P. Hitchcok and W. K. Riker: J. of Pharmacol. **87**, 400 (1946). — [32] Nachmansohn, D.: C. R. Soc. Biol. Paris **127**, 670 (1938). — [33] Nachmansohn, D.: Presse méd. **48**, 942 (1938). — [34] Nachmansohn, D.: J. Neurophysiol. **3**, 396 (1940). — [35] Sawyer, C. H.: J. of Exper. Zool. **92**, 1 (1943). — [36] Sawyer, C. H.: J. of Exper. Zool. **94**, 1 (1943). — [37] Schweitzer, A., and S. Wright: J. of Physiol. **89** 165 (1937). — [38] Travell, J., and H. Gold: J. of Pharmacol. **53**, 169 (1935). — [39] Wescoe, W. C., R. E. Green, B. P. McNamara and S. Krop: J. of Pharmacol. **92**, 63 (1948).

Alexander G. Karczmar, Department of Pharmacology, Georgetown University School of Medicine, 3900 Reservoir Road, Washington 7, D.C., U.S.A.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 273—283 (1953).

Aus dem biologischen Laboratorium der CIBA Aktiengesellschaft, Basel.

Zur pharmakologischen Analyse der Blutdrucksteigerung durch Coramin, Histamin und Nicotin bei der narkotisierten Katze*.

Von
H. J. Bein und R. Meier.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Februar 1953.)

Die heutige Pharmakologie der Wirkstoffe, die ins vegetative Nervensystem eingreifen, gründet sich im wesentlichen auf Befunde von Otto Loewi und H. Dale und seinen Mitarbeitern. Erst die Erkenntnis, daß bestimmten Wirkstoffen eine grundsätzliche Bedeutung bei der Übertragung vegetativ-nervöser Impulse zukommt, ermöglichte eine fruchtbare Entwicklung der Analyse vieler pharmakologischer Probleme und schuf damit auch die Grundlage für das Ausarbeiten spezifischer Pharmaka auf dem Gebiete des neuro-vegetativen Nervensystems. Pharmakodynamisch wirksame Verbindungen konnten in Analogie zu humoralen Überträger-Substanzen oder entsprechend ihrer Wirkung auf solche in Gruppen zusammengefaßt werden. Neben den typischen sympathicomimetischen Wirkstoffen gibt es blutdrucksteigernde Substanzen, deren Wirksamkeit nicht ohne weiteres als „sympathicomimetisch" angesprochen werden kann. Es bestehen aber theoretisch gewisse Möglichkeiten, derartige Wirkungskomponenten mit sympathicomimetischen Receptoren in Zusammenhang zu bringen, die aber erst bei genauerer Analyse erkennbar werden. In diesem Zusammenhang schien es genügend interessant zu versuchen, auf pharmakologischem Wege Blutdrucksteigerungen nach intravenöser Injektion von Coramin, Histamin und Nicotin zu differenzieren, da diese sich — wie noch näher ausgeführt werden wird — bei der Katze als adrenergisch und als weitgehend vom Vorhandensein der Nebennieren beeinflußt erweisen, wobei gerade dieser eine Faktor, Wirkungsabhängigkeit vom Vorhandensein der Nebennieren, bei jedem der 3 Pharmaka in grundsätzlich anderer Weise gedeutet werden darf.

Methodik.

Verwendet wurden etwa 3 kg schwere, nüchterne Katzen, die mit Dial-Urethan (35 mg/kg i.p. und 35 mg/kg s.c. Dial „CIBA") narkotisiert wurden.

Der arterielle Mitteldruck wurde in der Regel von der re. a. carotis communis auf ein Hg-Manometer mit Schwimmschreiber und die Atmung auf eine Mareysche Kapsel übertragen. Registrierung mit Russkymographion.

* Herrn Professor Dr. O. Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

Die Nebennieren wurden stets abdominal entfernt. Da nach früheren Versuchen Desoxycorticosteron während der über Stunden andauernden Versuche günstig auf die allgemeinen Kreislaufverhältnisse wirkt (Meier u. Bein, 1950) wurden jeweils nach beendeter Adrenalektomie 50 mg/Tier „Percortenglykosid CIBA" injiziert.

Zur Spinalisierung der Tiere wurde die klassische, von Burn (1952) kürzlich wiederum ausführlich beschriebene Methode verwandt. Um mögliche Unterschiede durch die Narkose zu vermeiden, wurden die Spinalkatzen ebenfalls mit der oben angegebenen Dosis von Dial-Urethan narkotisiert.

Die Dosen der untersuchten Stoffe sind in mg/kg angegeben.

Ergebnisse.

In früheren Mitteilungen beschrieben wir, daß intravenös injiziertes *Histamin* bei der Spinalkatze nur bei Anwesenheit spezifischer Nebennierenstoffe zu der bekannten biphasischen Blutdruckreaktion führt, und daß eine ausgesprochene sekundäre Blutdrucksteigerung beim nebennierenlosen Tier auch dann erhalten wird, wenn Spuren von Nor-Adrenalin oder von Adrenalin mit zugeführt werden (Meier u. Bein, 1950; Bein, 1951). Adrenalin und Nor-Adrenalin verhalten sich in dieser Beziehung gleich, während andere, nach einer akuten Adrenalektomie verändert gefundene Kreislaufwirkungen von Adrenalin und Histamin durch das Nor-Adrenalin spezifischer „normalisiert" werden. Andere kreislaufwirksame Stoffe, z. B. Pitressin, Tyramin, Sympatol und Privin sind unwirksam, auch wenn sie in relativ hohen Dosen zugeführt werden.

Diese sekundäre Histamin-Drucksteigerung verschwindet nach der Adrenalektomie meist nicht sofort, sondern nur allmählich; in einigen Versuchen bleibt sie nach etwa 15 min, in anderen erst nach etwa 60 min vollständig aus. Auch die Wirkung einer Nor-Adrenalin-Infusion klingt bei der akut nebennierenlosen Katze nur langsam ab. Es ist deshalb zu vermuten, daß der sekundäre Histamin-Druckanstieg nicht immer oder nur zum Teil durch ein Ausschütten von Pressorsubstanzen aus der Nebenniere bedingt ist, was seither auch durch Versuche von Slater u. Dresel (1952) unterstützt wurde. Diese fanden Histamin auch bei adrenalektomierten Katzen nach Gabe von Tetraäthylammoniumbromid und nach Hexamethonium blutdruckerhöhend.

Bei akut adrenalektomierten Katzen ist das Ausmaß der Blutdruckerhöhung nach Histamingaben abhängig von der Dosis des Adrenalins oder des Nor-Adrenalins, das gleichzeitig — durch eine andere Vene — infundiert wird (Abb. 1). Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß dieser Befund klinisch mit dem sogenannten Histamintest in Parallele gesetzt werden darf, d. h. mit der oft überschießenden Blutdrucksteigerung nach intravenösem Histamin bei einem Phaeochromocytom, einem Tumor, der sich auch klinisch durch einen großen Reichtum und Abgabe von adrenergischen Wirkstoffen auszeichnet. Nach neueren sorgfältigen

Untersuchungen an Katzen folgern Vogt (1952) und Outschoorn (1952), daß eine Ruhe-Sekretion von Nor-Adrenalin aus den Nebennieren wahrscheinlich sei.

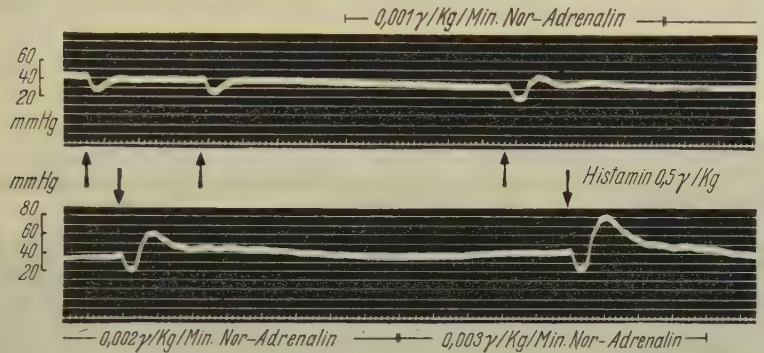


Abb. 1. Adrenalektomierte Spinalkatze. Arterieller Mitteldruck. Die nach Entfernen beider Nebennieren erhaltene einfache Blutdrucksenkung nach 0,5 γ/kg Histamin i.v. (v. femoralis) entwickelt sich bei Zufuhr von Nor-Adrenalin (v. jugularis) zu einer biphasischen Druckreaktion. Die sekundäre Steigerung ist um so ausgeprägter, je mehr Nor-Adrenalin zugeführt wird. Beim Pfeil jeweils i.v. Injektion von 0,5 γ/kg Histamin. Konstante intravenöse Infusion von 0,001 bzw. 0,002 bzw. 0,003 γ/kg/min Nor-Adrenalin. Zeitmarkierung 10 sec.

Auch bei nebennierenhaltigen Spinalkatzen vermag Nor-Adrenalin bzw. Adrenalin die Histaminblutdruckwirkung zu beeinflussen, da sie die durch häufige und in kurzen Intervallen verabfolgten Injektionen abgeschwächten Histamin-Blutdrucksteigerungen wiederum stark zu

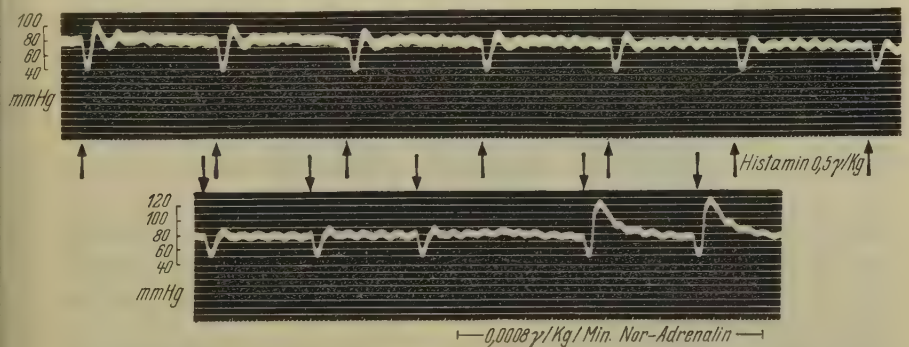


Abb. 2. Spinalkatze. Arterieller Mitteldruck. Tachyphylaktische Histaminwirkung (0,5 γ/kg i.v.) bei häufigen und in kurzen zeitlichen Abständen erfolgenden Injektionen und Wiederherstellen der sekundären Druckreaktion durch i.v. Infusion von 0,0008 γ/kg/min Nor-Adrenalin. Zeitmarkierung: 10 sec.

steigern vermögen. Für eine solche Restitutio der blutdruckerhöhenden Histaminwirkung beim nebennierenhaltigen Tier genügen in der Regel besonders kleine Dosen von Nor-Adrenalin oder von Adrenalin (Abb. 2).

Ähnlich dem Histamin sind bei der Spinalkatze kleine Dosen von intravenös injiziertem *Nicotin* nach beidseitiger Entfernung der Nebennieren nicht mehr blutdruckerhöhend. Im Unterschied zum Histamin klingen die Blutdrucksteigerungen nach dem Ausschalten der Nebennieren unmittelbar ab. Eine erneute Drucksteigerung ist durch Gabe von Nor-Adrenalin bzw. Adrenalin nicht mehr zu erreichen, auch wenn im Vergleich mit ähnlichen Versuchen mit Histamin sehr viel höhere Konzentrationen dieser sympathicomimetischen Wirkstoffe gewählt werden.

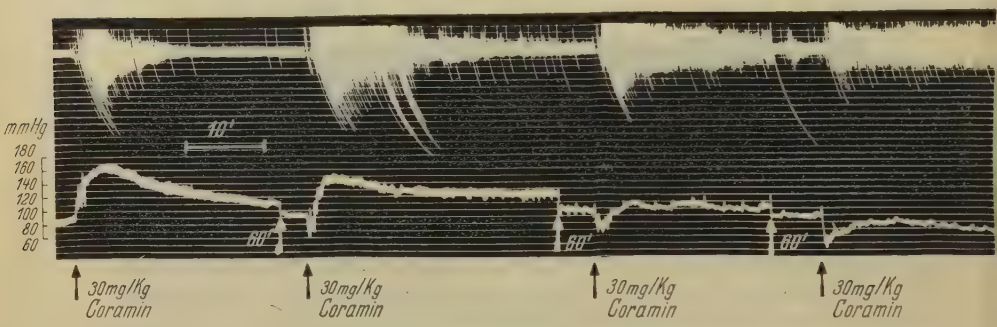


Abb. 3. Katze. Von oben nach unten: Atmung, arterieller Mitteldruck. Blutdrucksteigernder und atemstimulierender Effekt nach i.v. Coramin 30 mg/kg. Nachlassen der blutdrucksteigernden, jedoch nicht der atemstimulierenden Wirkung nach wiederholten Injektionen. Zwischen den Injektionen jeweils Pause von 60 min.

Über den Einfluß des *Coramin** auf den Blutdruck sind zahlreiche Mitteilungen erschienen (siehe dazu Hildebrandt, 1937; Hahn, 1941, 1948), ohne daß unseres Wissens untersucht wurde, wie weit die Coramin-Blutdruckwirkung vom Vorhandensein der Nebennieren abhängig sein könnte. Ähnlich wie bei Histamin verschwindet bei der Katze die blutdrucksteigernde Coraminwirkung nach beidseitiger Entfernung der Nebennieren nur allmählich; der atemstimulierende Effekt wird inkonstant beeinflußt, er kann ebenfalls deutlich nachlassen (Abb. 4), er kann auch nicht verändert werden. Ein Wiederherstellen der ursprünglichen Coraminwirkung durch Adrenalin oder Nor-Adrenalin ist jedoch nicht möglich, so daß sich hier die Coraminwirkung deutlich von der Histaminreaktion unterscheidet.

Im Gegensatz zum Verhalten beim Kaninchen ergab sich in Vorversuchen, daß der blutdrucksteigernde Effekt des Coramin bei der Katze nach wiederholten Injektionen rasch nachläßt und in einen depressiven Effekt übergehen kann, und daß eine Drucksteigerung beim Kaninchen leichter erhalten wird als bei der Katze; die Atemwirkung dagegen bleibt auch unter solchen Bedingungen reproduzierbar (Abb. 3). Andererseits fanden wir mit Cardiazol** bei der mit Dial-Urethan narkotisierten Katze eine schwächere blutdrucksteigernde Wirkung, häufiger eine

* Pyridin-β-Carbonsäure-diäthylamid.
** Pentatrazol (P. I.).

depressive Phase und ein rascheres Auftreten einer Tachyphylaxie als nach Coramin, so daß es uns nicht möglich war, Cardiazol in derselben Richtung zu untersuchen wie Coramin. Wegen dieser „tachyphylaktischen" Wirkung schien es notwendig, nur 1 bis höchstens 2 Kontrollinjektionen vor der Adrenalektomie vorzunehmen. Eine Beeinträchtigung der Coramin-Kreislaufreaktion allein durch das operative Manipulieren ließ sich nicht nachweisen. Ist eine solche tachyphylaktische Coraminwirkung eingetreten, so wird sie durch Adrenalin- bzw. Nor-Adrenalin-Infusionen ebenfalls nicht beeinflußt.

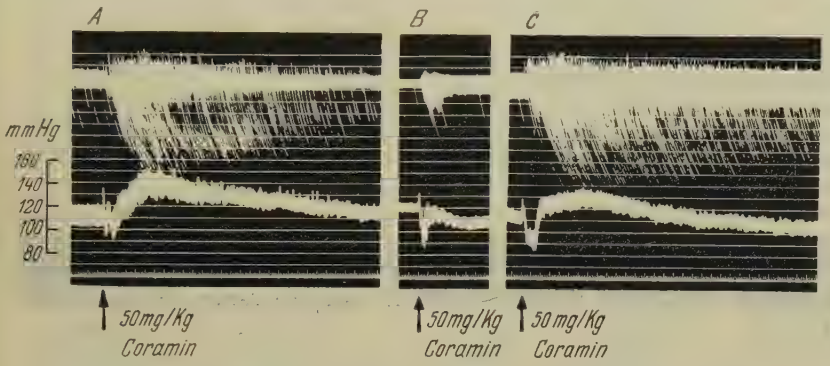


Abb. 4. Katze. Oben Registrierung der Atmung, unten des arteriellen Mitteldruckes. Beim Pfeil jeweils i.v. Coramin 50 mg/kg. Zwischen *A* und *B*: doppelseitige Adrenalektomie, zwischen *B* und *C*: i.v. Injektion von Cystein 30 mg/kg. Erklärung siehe Text. Zeitmarkierung: 10 sec.

Ist bei der normalen mit Dial-Urethan narkotisierten Katze ein sekundärer Blutdruckanstieg nach Histamin selten, dagegen an der Spinalkatze in der Regel zu beobachten, so findet sich nach Coramin bei Katzen mit durchtrenntem Halsmark meist kein Blutdruckanstieg. Wird dagegen nach der Spinalisierung eine genügend lange Zeit gewartet,

Abb. 5. Spinalkatze. Arterieller Mitteldruck. Coramin-Druckeffekt (jeweils 50 mg/kg i.v. Coramin) 1, 5 und 6 Std nach der Spinalisierung.

so kann sich im Verlauf von einigen Stunden auf eine intravenöse Injektion von Coramin wiederum eine Blutdrucksteigerung einstellen (Abb. 5). Diese Druckerhöhung verschwindet ebenfalls nach einer beidseitigen Nebennierenentfernung und ist dann gleich wie beim nichtspinalisierten Tier durch Adrenalin und durch Nor-Adrenalin nicht mehr wiederherstellbar.

Die früher von anderer Seite mitgeteilte Unwirksamkeit von Coramin an der Spinalkatze (z. B. Chakravarti, 1939), dürfte somit nicht auf ein Zerstören bestimmter Leitungsbahnen bzw. höherer Zentren zurückzuführen sein, sondern auf ein vorübergehendes Nichtreagieren der für die Coramin-Kreislaufreaktion verantwortlichen Receptoren, wobei offen bleibt, ob solche Substrate innerhalb des ZNS liegen. Dies wirft die Frage auf, ob es pharmakologisch möglich ist, diese Substrate wiederum zu aktivieren. Wir haben dabei nicht nur die Vorstellung, daß durch den Eingriff am ZNS und einen dadurch bedingten Schock Coramin-Receptoren in ihrer Ansprechbarkeit direkt verändert werden, sondern daß möglicherweise auch ein Verlust von Substanzen, notwendig für die Coramin-Wirkung, eintreten könnte, z. B. durch eine große Abgabe oder ein Unwirksamwerden von Nebennierenstoffen. Schließlich wäre auch zu erwägen, daß die eigentliche Kreislaufwirkung nicht durch das Coramin selbst bewirkt, sondern daß Coramin vielleicht nur als Trägersubstanz für ein aktives, üblicherweise mit der Nebenniere irgendwie verbundenes, Prinzip wirkt oder daß es lediglich der Anstoß für eine Reaktion bilden könnte.

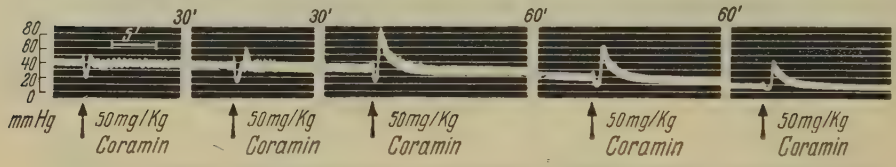


Abb. 6. Spinalkatze, unmittelbar nach der Spinalisierung. Blutdruckwirkung von 50 mg/kg Coramin i.v. unmittelbar nach Cystein 10 mg/kg i.v. und nach 30, 60, 120 und 180 min. Beachte das allmähliche Zunehmen der Coramin-Drucksteigerung und das langsame Abklingen.

Von solchen Erwägungen ausgehend, testierten wir die Wirkung von Substanzen, die biochemisch besonders ähnlich wie Adrenalin oxydoreduktiv in verschiedener Hinsicht als aktiv befunden wurden und wählten an erster Stelle *Cystein*.

Nach intravenöser Zufuhr von *Cystein* (10—30 mg/kg) führt Coramin an der Spinalkatze, welches — wie vorher ausgeführt — nach der Spinalisierung in der Regel während Stunden nicht mehr drucksteigernd wirkt, meist wiederum zu einer sehr ausgesprochenen Druckerhöhung (Abb. 6). Ist bei der Normalkatze der Blutdruckeffekt durch wiederholte Gabe von Coramin abgeschwächt, oder durch eine Adrenalektomie vollständig unterdrückt (Abb. 4), so wird er nach Cystein in etwa 80% der Versuche wieder hergestellt. Cystein vermag somit einen Coramineffekt, sei es, daß dieser durch einen Eingriff am ZNS, sei es infolge tachyphylaktischer Wirkung oder operativem Ausschalten der Nebennieren ausbleibt, wieder herzustellen, wobei die „Cysteinwirkung" sich erst nach einer längeren Latenz voll auswirkt. Dieser Cysteineffekt beschränkt sich nicht nur auf das Coramin, sondern wird, wie wir früher berichteten, ähnlich auch beim Histamin beobachtet (Bein u. Meier, 1952). Auch hier wird durch Cystein die Histamin-Blutdrucksteigerung, die nach einer vollständigen Adrenalektomie ausbleibt, „wieder hergestellt"; bei Normaltieren, bei welchen intravenös injiziertes Histamin

kaum zu einer eigentlichen Drucksteigerung führt, kann eine solche nach intravenösem Cystein ebenfalls deutlich hervortreten. Die Wirkung des Cysteins ist am selben Tier wiederholbar.

Nicotin dagegen führt bei der adrenalektomierten Katze auch nach Cystein zu keiner Blutdrucksteigerung mehr.

Es ist charakteristisch, daß — ähnlich wie beim Coramin — Histamin nach Cystein erst nach einer Latenzperiode, die oft bis 60 min dauert, wirksam wird, und daß die Blutdrucksteigerungen nach Erreichen eines Maximums nur allmählich wieder abnehmen. Diese doch lange Latenz zwischen der i.v. Injektion von Cystein und der zu beobachtenden Wirkung auf das Coramin und auf das Histamin läßt vermuten, daß nicht das Cystein direkt an der Blutdrucksteigerung dieser Stoffe beteiligt ist, sei es, daß es für den Ablauf einer Reaktion von Bedeutung ist, sei es, daß es selbst zu einer in der untersuchten Beziehung aktiven Verbindung erst umgeformt werden muß. Ob das Cystein wesentlich ist für ein Umstimmen von Receptorenfeldern oder außerhalb der Nebennieren zur Bildung von Stoffen, die für die drucksteigernde Wirkung des Coramin und des Histamins notwendig sein könnten, läßt sich nicht vollständig übersehen. Im Falle des Histamins haben wir früher mitgeteilt (Bein u. Meier, 1952), daß den Nieren insofern eine wesentliche Rolle zukommt, als die Histamindrucksteigerung, die bei der adrenalektomierten Spinalkatze nach Cystein wieder auftritt, durch Abklemmen der beidseitigen Nierengefäße unterdrückt wird, um nach Freigabe der Nierendurchblutung wieder zu erscheinen. Dies im Gegensatz zum Verhalten bei einer Nor-Adrenalininfusion, da dort ein Ausschalten der Nieren aus der allgemeinen Zirkulation die Entwicklung der sekundären Histaminreaktion nicht beeinflußt. Ob unter dem Einfluß des Cysteins in der Niere Stoffe gebildet werden, die für die sekundäre Histamindruckreaktion wesentlich erscheinen, läßt sich nur vermuten, da direkte Beweise für ein Ausschütten humoraler Wirkstoffe aus der Niere unter Cysteineinfluß fehlen. Möglich auch, daß unter den besprochenen Versuchsbedingungen durch das Cystein Fermente aktiviert werden, die für die Synthese adrenergischer Wirkstoffe als bedeutungsvoll angesehen werden, wie z. B. die Dopadecarboxylase, die nach Holtz (1949) in der Niere und nach Langemann u. Blaschko (siehe Burn, 1951) in der Nebenniere vorkommt.

Dem operativen Eingriff und dem Manipulieren an den Nierengefäßen kommt kein Einfluß zu; wirksam ist lediglich das Ausschalten der Nieren aus der Zirkulation. Dies dürfte u. a. auch dadurch illustriert werden, daß bei einem Versuch, in welchem Cystein wirkungslos blieb, dagegen nicht eine Nor-Adrenalin-Infusion, sich eine schwere Cystenniere fand, eine Beobachtung, die uns eigentlich veranlaßte zu versuchen, die Rolle der Niere näher abzuklären. In einem anderen Versuch wurde die sekundäre Histamin-Druckreaktion nach einer beidseitigen Adrenalektomie ausnahmsweise nur wenig vermindert; Entfernung der Milz blieb ebenfalls wirkungslos, während auf Abklemmen der Nierengefäße die Histamin-Druckerhöhung sich stark verringerte.

Ob die Nieren allein mitverantwortlich sind, läßt sich nicht mit Sicherheit angeben; Resektion der Milz blieb ohne Einfluß.

Da die blutdrucksteigernde Wirkung des Adrenalins und des Nor-Adrenalins nach intravenösem Cystein ebenfalls verstärkt wird, wobei sich ein Maximum ebenfalls erst nach einer gewissen Zeit feststellen läßt, war ferner zu prüfen, ob dieser „Cysteineffekt" nicht nur auf einer sensibilisierenden Wirkung gegenüber Adrenalin bzw. Nor-Adrenalin-

Blutdruckwirkungen beruht, und ob möglicherweise auch mit anderen Stoffen, die zu einer Verstärkung führen, ein ähnliches Verhalten beobachtet würde. Ephedrin, das wir hierauf untersuchten, war nicht nur wirkungslos, sondern blockierte die vorher beschriebene Wirkung des Adrenalins bzw. des Nor-Adrenalins gegenüber Histamin (Abb. 7) und die Wirksamkeit des Cysteins gegenüber Coramin.

Obgleich durch das Cystein die Coramin-Blutdruckwirkung formal ähnlich wie der Histamin-Druckeffekt beeinflußt wird, bleiben in bezug

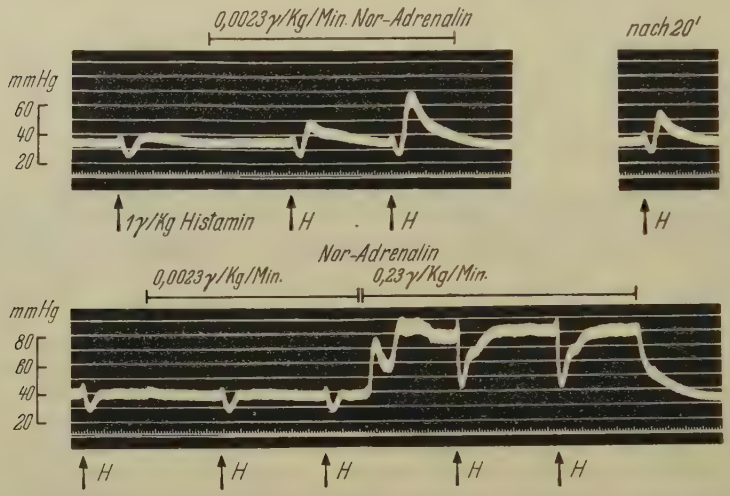


Abb. 7. Beidseitig adrenalektomierte Spinalkatze. Arterieller Mitteldruck. „Wiederherstellen" der ursprünglichen pressorischen Histaminwirkung durch eine Nor-Adrenalin-Infusion (obere Kurve; rechts außen 20 min nach der Nor-Adrenalin-Infusion); nach Ephedrin bleibt auch die 100fache Nor-Adrenalinmenge wirkungslos (untere Kurve, nach Ephedrin 0,1 mg/kg i.v.). Bei *H* jeweils i.v. Histamin 1 γ/kg. Zeitmarkierung: 10 sec.

auf das Coramin Eingriffe an der Niere erfolglos, da Coramin beim adrenalektomierten Tier nach Cystein auch bei ausgeschalteten Nieren den arteriellen Druck zu erhöhen vermag. Die Wirkung des Cysteins ist somit gegenüber dem Coramin und gegenüber dem Histamin verschieden.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob dem Cystein verwandte Verbindungen in ähnlicher Weise wirken. Gegenüber Histamin wurden unwirksam gefunden:

dl-Methionin, Glutathion, BAL, Ergothionein, l-Cystin, Dopa, ATP, l-Ascorbinsäure und Methylenblau, obgleich sie bis zur maximal tolerierten Dosis getestet wurden (Bein u. Meier, 1952). Möglicherweise ist die Wirkung einzelner dieser Verbindungen in unserer gewählten Versuchsanordnung nicht ersichtlich, trotzdem sie vielleicht prinzipiell wirksam sein könnten. Auch gegenüber Coramin zeigten einige dieser

Verbindungen, soweit sie von uns geprüft wurden (Methionin bis zu einer geprüften Gesamt-Dosis von 190 mg/kg intravenös und Cystin), keine dem Cystein entsprechende Wirkung.

Bei dieser Differenziertheit schien es aufschlußreich, zu prüfen, ob eine weitere Bestimmung des Angriffspunktes auf pharmakologischem Wege durch Ermittlung von vielleicht spezifischen Antagonisten möglich wäre. Da die 3 untersuchten Stoffe Blutdrucksteigerungen anscheinend adrenergischen Charakters bewirken, wurden Antagonisten des sympathischen Nervensystems mit einem spezifischen Wirkungsmechanismus gewählt, und zwar einerseits das ganglionär blockierende Pendiomid, andererseits das Sympathicolyticum Regitin, das die Wirkung von Adrenalin bzw. Nor-Adrenalin und somit die sympathische Endstufe hemmt:

Regitin* hemmt die Blutdrucksteigerungen nach Histamin, Nicotin und nach Coramin; Pendiomid** dagegen vermag nur diejenige nach Nicotin zu blockieren, während es diejenigen nach Histamin und nach Coramin in der Regel verstärkt. Bei der akut adrenalektomierten Katze wirkt Histamin zusammen mit Nor-Adrenalin bzw. Adrenalin nicht mehr drucksteigernd, sofern Regitin gegeben wird; ebenfalls hemmt Regitin die durch Cystein „wieder hergestellten" Coramin- und Histaminblutdrucksteigerungen. Pendiomid dagegen blockiert nicht.

Die durch die 3 untersuchten Substanzen hervorgerufenen Drucksteigerungen lassen sich somit zwanglos als „adrenergisch" klassieren. Dies steht insofern mit entsprechenden Literaturangaben in Übereinstimmung als Frommel u. Beck (1950) die Coraminblutdrucksteigerung bei der Ratte mit Ergotamin, Slater u. Dresel (1952) diejenige nach Histamin bei der Katze mit Dibenamin hemmten. Nur die durch Nicotin ausgelöste Drucksteigerung ist gleichzeitig durch Pendiomid und durch Adrenalektomie — wie auch durch Regitin — hemmbar, so daß nur bei diesem Pharmakon ein echtes Ausschütten von Pressorstoffen durch Erregen von Nebennierenzellen angenommen werden kann.

Es scheint unwahrscheinlich, daß Coramin und Histamin denselben Angriffspunkt wie Nicotin haben, und daß Pendiomid gegenüber Coramin und Histamin deshalb unwirksam sein könnte, weil seine eigene ganglienblockierende Wirkung durch sie zunichte würde, da Coramin i.v. am Gangl. cervic. sup. der Katze die ganglienblockierende Wirksamkeit von Pendiomid i.v. nicht beeinträchtigt. Histamin nach Pendiomid wirkt an beidseitig adrenalektomierten Spinalkatzen nicht drucksteigernd, dagegen ist es in Übereinstimmung mit den Angaben von Slater u. Dresel (1952) nach 10—20 mg/kg i.v. Tetraäthylammoniumbromid schwach blutdruckerhöhend, nicht aber nach Hexamethonium. Möglicherweise könnte dies dadurch erklärt werden, daß adrenergische Wirkstoffe durch ganglienstimulierende

* 2-(N-p'-Tolyl-N-μ-oxyphenyl-aminomethyl)-imidazolin.

** N,N,N',N'-3-Pentamethyl-N,N'-diäthyl-3-aza-pentylen-(1,5)-diammoniumdibromid.

Eigenschaften des Tetraäthylammoniumbromids (Bein u. Meier, 1951) aus extramedullär gelegenen Anteilen des chromaffinen Systems ausgeschüttet werden.

Auf Grund unserer Versuche läßt sich nicht entscheiden, ob die sekundäre Histamindrucksteigerung durch eine oder mehrere vom Histamin unabhängige und lediglich induzierte adrenergische Wirkstoffe bedingt ist — wobei diese dann durch Regitin bzw. andere Sympathicolytica hemmbar wären —, oder ob dem Histamin eine eigene biphasische Wirkung zukommt: Wird beim adrenalektomierten Tier die während einer Nor-Adrenalin-Infusion wiederhergestellte Histamin-Drucksteigerung durch dazu gerade ausreichende Dosen von Regitin unterdrückt, so läßt sich diese Regitinhemmung wiederum durch höhere Konzentrationen von Nor-Adrenalin durchbrechen. Die Hemmung der sekundären Histamindrucksteigerung bei der Nebennieren besitzenden Katze durch Sympathicolytica könnte somit auch durch eine Blockierung der normalerweise aus den Nebennieren ausgeschiedenen, für die Histamindruckreaktion verantwortlichen, adrenergischen Wirkstoffe erklärt werden und weniger durch eine Hemmung einer „adrenergischen Histamindruckphase".

Trotzdem sich der Coramin- und der Histamin-Kreislaufeffekt unterscheiden, da Coramin nach der Adrenalektomie auch in Gegenwart von Nor-Adrenalin bzw. Adrenalin nicht mehr drucksteigernd wirkt, ist offenbar für beide Stoffe eine, durch Regitin hemmbare, vermutlich „adrenergische" Komponente ausschlaggebend. Beim Coramin sind vielleicht andere Wirkstoffe, die aus den Nebennieren stammen, als Nor-Adrenalin, Adrenalin und Desoxycorticosteron, grundsätzlich von Bedeutung. Ob hier möglicherweise auch ein Zusammenhang besteht mit dem Befund, daß Coramin — im Gegensatz zum Verhalten des Histamins — nach Cystein auch bei ausgeschalteten Nieren zu wirken vermag, ist nicht klar. Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß sich selbstverständlich auch in anderen Beziehungen grundsätzliche Unterschiede zwischen Blutdrucksteigerungen nach Coramin und solchen nach Histamin finden lassen, da sich z. B. durch Antihistaminica wohl die Histaminkreislaufwirkung, nicht aber die Coraminblutdruckreaktion hemmen läßt.

Wir haben schon früher darauf hingewiesen, daß für die sekundäre Histamin-Blutdrucksteigerung nicht nur die Nebennieren bzw. Adrenalin und Nor-Adrenalin, sondern noch andere Faktoren bedeutungsvoll sein müssen. An Hand der vorliegenden Unterlagen können wir nicht entscheiden, ob durch das Cystein ein solch „anderer" Faktor aktiviert wird, oder ob nach seiner Applikation im wesentlichen ähnliche Bedingungen erfüllt werden wie nach Zufuhr von Nor-Adrenalin/Adrenalin. Eine Differenzierung mit pharmakologisch antagonistisch wirkenden Stoffen ließ sich bisher nicht erreichen.

Summary.

1. The hypertensive action of Coramine, histamine and of small doses of nicotine on the cat is dependent on the presence of the adrenal gland. There is no equivalent effect after bilateral adrenalectomy.

2. A simultaneous infusion of traces of nor-adrenaline and/or adrenaline restores the biphasic histamine reaction, but not that provoked by nicotine and by Coramine.

3. When Cysteine is applied intravenously, both, Coramine and histamine act after a considerable latency period, while nicotine does not regain its hypertensive capacity.

4. Although Cysteine in the adrenalectomised cat restores the capacity of histamine to raise the blood pressure, this takes place only while

the kidneys are not cut off from the general circulation. Coramine, on the other hand, retains its hypertensive action after Cysteine, even though the renal vessels are tried off. If nor-adrenaline is given, however, histamine retains its hypertensive effect even when the renal vessels are occluded.

5. Blood pressure increases produced by Coramine, histamine and nicotine are inhibited by the sympathicolytic Regitine. The ganglionic blocker Pendiomide inhibits only nicotine.

6. The findings and their implications are discussed.

Herrn Ch. Schmid danken wir für seine überaus sorgfältige technische Mitarbeit.

Literatur.

Bein, H. J.: Helvet. physiol. acta **9**, C 16 (1951). — Bein, H. J., u. R. Meier: Schweiz. med. Wschr. **81**, 446 (1951). — Helvet. physiol. acta **10**, C 45 (1952). — Burn, J. H.: Ir. J. Med. Sci., p. 345 (1951). — Practical Pharmacology. Oxford 1952. — Chakravarti, M.: J. of Pharmacol. **67**, 153 (1939). — Frommel, E., u. J. T. Beck: Schweiz. med. Wschr. **80**, 13 (1950). — Hahn, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **198**, 472, 491, 509 (1941). — Hahn, F., u. K. Simon: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 563 (1948). — Hildebrandt, F.: Handb. exper. Pharmakol., 5. Erg.-Bd. Berlin 1937. — Holtz, P., u. G. Kroneberg: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 150 (1949). — Meier, R., u. H. J. Bein: Helvet. physiol. acta **8**, 436 (1950). — Outschoorn, A. S.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 605 (1952). — Slater, J. H., and P. E. Dresel: J. of Pharmacol. **105**, 101 (1952). — Vogt, M.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 325 (1952).

Dr. H. J. Bein, Biol. Laboratorium der CIBA-AG., Basel/Schweiz.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 284—290 (1953).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Zürich.

Vergleichende physiologische und pharmakologische Untersuchungen der Iris-Muskulatur*.

Von
W. R. Hess.

(Eingegangen am 21. März 1953.)

Die Funktion des ins Auge gefaßten Muskelapparates besteht offenkundig in erster Linie in der Regulation der ins Auge einfallenden Lichtmenge. Dabei stellt man sich im allgemeinen den Mechanismus sehr einfach vor, indem das Verhältnis der vom Sphinkter und vom Dilatator aufgebrachten Kräfte in peripherem Gegenspiel die Pupillenweite bestimmen. Indem dabei adrenergische bzw. cholinergische Wirkstoffe mit den 2 innervatorischen Komponenten des vegetativen N. S. gemäß der Entdeckung von O. Loewi auf einen Nenner gebracht werden, ist eine vertiefte Einsicht in die obwaltenden Verhältnisse gewonnen. Der folgende Bericht soll insofern noch einen Schritt weiter führen, als der *quantitativen Seite* besondere Beachtung geschenkt wird. In diesem Sinne richten wir unsere Aufmerksamkeit speziell auf einen *Vergleich zwischen verschiedenen Tierarten*, was uns, wie wir sehen werden, zu Resultaten führte, welche man nicht von vornherein erwarten konnte. Indem ich zusammen mit einigen Mitarbeitern (W. Koella, Th. Szabo, J. C. Rüegg) mich diesen Aufgaben zugewendet habe, blieb das Interesse nicht nur auf das spezielle Thema beschränkt. Denn es wurde auch eine genauere Einsicht in den Mechanismus regulatorischer Vorgänge erstrebt, soweit sie auf dem Wettstreit antagonisierender Kräfte beruhen. Zu diesem Zwecke erschien das Irispräparat deshalb besonders geeignet, weil seine Zartheit eine rasche Durchdringung der in verschiedenen Dosierungen der Nährlösung zugesetzten Wirkstoffe gestattet, ein Umstand, welcher nicht nur für die Zuverlässigkeit der Meßresultate, sondern auch für die Beurteilung des zeitlichen Verlaufes einer Reaktion wesentlich ist.

Zum Unterschied von Untersuchungen anderer Autoren am Irispräparat (Josef, R.[8], Wessely, K.[15], Ten Cate, J.[13], Poos, F.[11] u. a. m.) kam eine Technik zur Anwendung, bei welcher die von den in geeignete Nährlösung übertragenen isolierten Muskeln entwickelten *Kräfte direkt* registriert wurden und zwar unbeeinflußt von Störungen, wie sie bei isotonischer Aufzeichnung infolge der Deformation struktureller Elemente der Iris unvermeidlich sind. Genaue methodische Angaben, inbegriffen die Zusammensetzung der Nährlösung, sind an anderer Stelle gemacht, wo sich auch noch weitere Literaturangaben befinden ([4, 7, 12]).

* Herrn O. Loewi zu seinem 80. Geburtstag gewidmet.

Sphinkterring bzw. Dilatatorstreifen, in das Mikrodynamometer eingespannt, zeichneten in der ursprünglichen technischen Ausführung mechanisch, später optisch bis 100fach vergrößert ihre Spannungsschwankungen auf.

Die in einer Reihe von Arbeiten im einzelnen mitgeteilten Befunde sollen hier gegenübergestellt, und die sich dabei ergebenden Folgerungen gezogen werden.

Spontaner Tonus und Tonusschwankungen der Iris-Muskulatur.

Sowohl der Sphinkter als auch der Dilatator iridis sind nach ihrer Isolierung mehr oder weniger, unter Umständen sogar krampfartig kontrahiert. Nach Einspannung in das Mikrodynamometer und Versenkung in die Nährlösung kommt es unter dem Einfluß einer leichten, von der Dynamometerfeder ausgeübten Zugkraft zu einer Dehnung des Präparates, wodurch sich ein Gleichgewichtszustand zwischen Zug und Gegenzug herstellt. Eine autonome Tonisierung kann man übrigens schon in situ feststellen, d. h. wenn in die Vorderkammer des enukleierten Auges nach Absaugen von etwas Kammerwasser mittels Pravazspritze eine kleine Sauerstoffblase injiziert wird. Die bald nach der Tötung des Tieres sistierte Gewebeatmung kommt wieder in Gang und damit kehrt auch der Muskeltonus zurück, was sich besonders an der Wirkung des Sphinkters geltend macht. — Die oben erwähnte Gleichgewichtslage zwischen autonomem Grundtonus und Federspannung bedeutet aber nicht vollkommene Ruhe. Die fast immer zu beobachtenden kleinen Wellen zeigen an, daß der periphere Tonus dauernden Schwankungen unterworfen ist. Beim Sphinkter vom Schwein, welcher besonders gut ausgebildet ist, lassen sich z. B. deutliche Wellen mit einer Phasendauer von fast 1 min feststellen, welche durch wesentlich frequentere Wellen überlagert sein können. Ein autonomer Tonus kann, ebenfalls mit kleinen spontanen Schwankungen, auch am Dilatator iridis z. B. am Rind beobachtet werden, wenn auch nicht so regelmäßig. Die Erfahrung hat gelehrt, daß trotz sorgfältigen Vorgehens bei der Präparation die spontane Tonisierung unter Umständen vollständig vermißt werden kann. Dafür ist aber nicht der Zeitintervall zwischen der Tötung des Tieres und Entnahme des Präparats aus dem Auge verantwortlich, sofern man die sauerstoffversorgten Augen nicht länger als 4—5 Tage im Eisschrank (bei 4°) aufbewahrt. Einen Grund für das Fehlen der autonomen Tätigkeit konnten wir nicht finden, so daß uns vorläufig nichts übrig blieb, als von guten und schlechten Präparaten zu sprechen; denn es hat sich auch gezeigt, daß das Fehlen des autonomen Tonus in der Regel ein Versagen oder nur angedeutetes Ansprechen des Präparates präjudizierte. Eine andere, bereits angetönte Variante betreffend das spontane Verhalten eines Präparates, ist eine andauernde krampfartige Kontraktion, wie man sie besonders am Sphinkter der *Katze* beobachtet. Auch solche Verhältnisse

sind ungünstige Ausgangsbedingungen, da durch den Krampf die Bewegungsfreiheit herabgesetzt bzw. aufgehoben ist. Zwischen den beiden Extremen befindet sich die günstigste Ausgangslage, wenn nämlich der passiven Dehnung des Präparates ein schwacher Grundtonus entgegensteht.

Im Zusammenhang mit der Feststellung autonomer Tonusschwankungen der Irismuskulatur ergibt sich die Frage nach ihrer physiologischen Bedeutung. Indem wir dazu Stellung nehmen, denken wir daran, daß auchbei anderen Organen des vegetativen Systemes spontane Tonusschwankungen zu beobachten sind. Eine große Ähnlichkeit besteht speziell zum Verhalten der zirkulären Arterienmuskulatur (Bürgi, S.[1], Ducret, S.[3]). Wie bei der Irismuskulatur ist auch bei ihr eine Zunahme der Amplituden zu beobachten, wenn der Nährlösung kleine bis kleinste Dosen des aktivierenden Wirkstoffes zugesetzt werden. — Betreffend die zirkuläre Arterienmuskulatur haben anerkannte Autoren in den Tonusfluktuationen einen Beitrag zur Förderung des Blutstromes erblickt, obgleich die Schwankungen für wirksame Strömungsimpulse unseres Erachtens viel zu träge verlaufen. Bei der Pupille kommt ein zusätzlicher Förderimpuls von vornherein nicht in Betracht. Um so eher weisen die autonomen Wellen darauf hin, daß die Erregung der muskulären Elemente hier wie bei den anderen vegetativ gesteuerten Organen Ausdruck einer gewissen *Labilität im Gleichgewicht* ist und vermutlich die Tonisierung der einzelnen Elemente eines Muskelbündels nicht vollkommen synchronisiert ist. Die Folge solcher Verhältnisse gewährleistet ein Ansprechen der in ständigem Wettstreit befindlichen Antagonisten schon auf feinste zusätzliche Einflüsse, indem das fluktuierende dynamische Gleichgewicht eine besonders fein arbeitende Anpassung an veränderte Verhältnisse ergibt[4].

Die Reaktivität des Sphinkter iridis.

Bei der Prüfung dieses Muskels steht physiologischerweise sein Ansprechen auf Acetylcholin im Vordergrund. Zwar wird dieser körpereigene Wirkstoff von bekannten körperfremden Pharmaka weit übertroffen. Es scheint dieses Phänomen aber eher eine Angelegenheit des Durchtritts durch die Cornea zu sein, als der Reaktivität des Sphinkters. Jedenfalls ist es Tatsache, daß man bei direktem Kontakt mit Acetylcholin schon bei Verdünnungen von 10^{-7} bis 10^{-6} kräftige Kontraktionen bekommen kann. Die schönsten Effekte wurden beim Sphinkter des Schweines erzielt, welcher deshalb dazu benutzt wurde, einige besondere Experimente anzustellen. Gut ist auch die Reaktion beim Sphinkter vom Rind[7].

Wenig Verwertbares erhielten wir bei der Katze, augenscheinlich deshalb, weil die kreisförmige Isolierung des Sphinkters mittels Irisschere eine so starke Reizung hinterläßt, daß ein langdauernder Kontraktionszustand die Folge ist und der in sich zusammengezogene Ring, wie oben erwähnt, keine Bewegungsfreiheit hat.

Am Sphinkter des Schweines versuchten wir zuerst die Beziehungen zwischen Konzentration des Wirkstoffes und der produzierten Kraft klarzustellen. Dabei hat es sich gezeigt, daß letztere mit ersterem keineswegs parallel geht. Um ein lineares Ansteigen der Spannkraft zu erreichen, muß die Ac.Ch.-Konz. in geometrischer Progression gesteigert werden (Hess, W. R.[5], Koella, W.[6]). Diese Analogie, dem für Sinnesorgane (innerhalb bestimmter Grenzen) bekannten Weber*schen Gesetz* ist bemerkenswerterweise analog auch am Herzen beobachtet worden (Clark, A. J.[2]), ferner am Corpus ciliare (Meesmann, A.[10]). Diese Erfahrungen deuten auf eine grundsätzliche Relation zwischen Reizdosierung zu vitalen Reaktionen hin, wobei wir die schon früher ausgesprochene Vermutung bestätigen, daß diese Verhältnisse vielleicht bei der Einstellung auf *funktionelle Optima* Bedeutung haben.

Eine weitere Beobachtung von allgemeinerem Interesse betrifft das Verhältnis zwischen der Wirkung von Ac.Ch. und Atropin. In feiner Abstufung successiv appliziert findet die Erfahrung Ausdruck, daß der Einfluß des Wirkstoffes durch ebenfalls stufenweise erhöhte Konzentrationen des Hemmungsstoffes unterdrückt werden kann[4,7]. Immer läßt sich mit steigendem Titer einerseits des Reiz- und andererseits des Hemmungsfaktors ein neuer Gleichgewichtszustand erreichen.

Der Dilitator iridis.

Wenn nach einfachem Schema der Sphinkter iridis als Effector cholinergischer Innervation angenommen ist, welchem der Dilatator iridis als Erfolgsorgan adrenergischer Innervation entgegenwirkt, mag es fast überflüssig erscheinen, auch die Wirkung von Adrenalin (bzw. l-Noradrenalin) auf den letzteren nachzuprüfen, um so mehr, als schon Wessely[15] am isolierten Dilatatorpräparat die Aktivierung durch Adrenalin eindeutig dargestellt hat. Die Ergebnisse orientierender Versuche bestimmten uns aber trotzdem zu weiteren vergleichenden Experimenten. Dabei zeigte es sich, daß der isolierte, spontan tonisierte oder durch Ac.Ch. zur Kontraktion gebrachte Sphinkter auf Adrenalin mit prompter Erschlaffung antwortet (Hess, W. R., Koella, W.[5, 7], Ruegg, I. C.[9]). In Ausdehnung dieser Versuche auf verschiedene Tierarten unter abgestufter Dosierung des Wirkstoffes wurde dabei eine früher schon von anderer Seite (Poos[11]) gemachte Beobachtung bestätigt und erweitert. Um den entspannenden Einfluß zustande zu bringen, bedarf es einer Adrenalinkonzentration von 10^{-7} bis 10^{-7} g/ml. Wie Adrenalin wirkt auch l-Noradrenalin, wobei aber von einer verstärkten Wirkung nicht gesprochen werden kann. Im allgemeinen ist eher das Gegenteil der Fall. Beachtenswert ist die Erfahrung, daß die Adrenalin- und l-Noradrenalin-Erschlaffung auffallend rasch eintritt und schnell verläuft, im Gegensatz zur Atropinhemmung der Ac.Ch.-Konz. Vermutlich

ist dieser Unterschied das Zeichen verschiedener Wirkungsmechanismen. Dagegen legen wir Gewicht auf die Feststellung, daß bei der Regulation der Pupillenweite 2 verschiedene Antagonismen im Spiel sind. Der eine ist chemischer Natur, indem der einzelne Effector (Sphinkter) cholinergisch gespannt und adrenergisch entspannt wird. Der andere Antagonismus hat mechanischen Charakter, wobei einerseits die vom Sphinkter, anderseits die vom Dilatator aufgewendeten Kräfte im Wettstreit liegen und sich auf eine dynamische Gleichgewichtslage einspielen.

Werden die Wirkungen des N. sympathicus und des entsprechenden humoralen Faktors auf den Dilatator ins Auge gefaßt, so stellt sich die pharmakologische Frage nach der kontraktionslösenden Wirkung von Dihydroergotamin[6]. Es handelt sich dabei um einen am Kaninchen zu beobachtenden Idealfall. Indem wir auch hier dem zeitlichen Verlauf der Spannungs- und Entspannungsphase Aufmerksamkeit schenken, bemerkt man die früher schon für Atropin hervorgehobene relativ träge Löschung des aktivierten Muskels[7]. Dieser Parallelismus verdient Interesse. — Als eigentliche Überraschung dürfen in diesem Zusammenhang 2 andere Tatbestände vermerkt werden: Wenn man im Anschluß an Untersuchungen mit Kaninchen-Dilatatoren arbeitet, so ist man wegen der mangelhaften Reaktionsfähigkeit des Dilatators vom Schwein unzufrieden. Man mag noch so vorsichtig als möglich zu Werke gehen, so gelingt es doch nicht, weder durch Adrenalin noch durch l-Noradrenalin eine Kraft hervorzubringen, welche über ein eben deutliches Minimum hinausgeht. Dazu kommen häufige Versager. Da, wie gesagt, mit der gleichen, sonst gut bewährten Technik gearbeitet worden war, muß diese ausgesprochene Insuffizienz irgendwie ihren biologischen Grund haben. Man wird sich darüber klar, wenn die Schweine-Iris einer genauen histologischen Untersuchung unterworfen wird. Hierbei zeigt es sich nämlich, daß der Dilatator iridis ungewöhnlich schwach entwickelt ist, während die elastischen Bindegewebsfasern durch ihre große Zahl und eine besonders gitterartige Anordnung auffallen (Theiler, K.[14]). So bestätigt der histologische Befund das Ergebnis des physiologischen Experimentes, daß nämlich beim Schwein die Regulierung der Pupillenweite vorwiegend „in der Hand" des Sphinkters liegt, der ja, wie wir eben hörten, auch besonders gut ausgebildet ist. Entsprechend werden je nach der Innervation kleinere oder größere Kräfte entwickelt, die sich mit dem Gegenzug von elastischen Gewebselementen ins Gleichgewicht setzen. Im Prinzip liegen hier also ähnliche Verhältnisse vor wie beim Akkomodationsmechanismus. Im Gegensatz dazu befinden sich bei Katze, Kaninchen und auch beim Menschen einerseits konstringierende, anderseits dilatierende Muskelkräfte im Wettstreit. Wenn man nach einer physiologischen Motivierung der besonderen Verhältnisse und nach einer Beziehung zur Lebensweise sucht, so ist damit

eine Frage aufgeworfen, die zu verfolgen reizvoll, aber auch recht schwierig wäre.

Einer zweiten Besonderheit des Dilatators iridis des Rindes begegnen wir insofern, als er sich nach seiner Isolierung in vitro spontan auffallend kräftig anspannt. — Ganz aus dem Rahmen bisheriger Erfahrung fällt schließlich die Reaktionsweise des Iris-Dilatators des Rindes in jenen Fällen, wo das Präparat der Breitseite der querovalen Iris entnommen ist. Dieses reagiert nämlich auf Adrenalin (und l-Noradrenalin) konsequent mit Erschlaffung. Ferner fällt auf, daß die erwähnte Adrenalin-Erschlaffung durch Dihydroergotamin nicht aufgehoben, sondern im Gegenteil noch weiter getrieben wird, sich also dem Adrenalineffekt superponiert. Beim Schmalseitenpräparat ist die Kontraktion des Dilatators auf Zugabe der genannten Sympathicomimetica dagegen die Regel, besonders bei Ausschnitten aus dem nasalen Abschnitt. Die Versuchung liegt nahe, diese außergewöhnlichen Verhaltungsweisen der Dilatatorpräparate mit den besonderen Spannungsverhältnissen in einer ovalen Form der Pupillenöffnung in Beziehung zu setzen. Was die histologische Untersuchung der Iris vom Rind betrifft, so bestätigt sie, daß hier sehr komplexe Verhältnisse vorliegen, welche nach weiteren Untersuchungen rufen (Rickenbacher, I.[12]).

Zusammenfassung.

Es wurden die Eigenschaften der isolierten Irismuskeln hinsichtlich des Spontanverhaltens, ihrer Reaktion auf cholinergische und adrenergische Wirkstoffe und auf den Einfluß typischer Hemmungssubstanzen untersucht. 4 verschiedene Tierarten wurden zum Vergleich herangezogen. — Nicht unerwartet ist der in der Regel sich zeigende autonome Tonus und seine Spontanschwankungen. Bemerkenswert ist der Befund, daß Wirkstoff und Spannkraft nicht in proportionalem Verhältnis stehen, sondern daß das quantitative Verhältnis beider wie bei Sinnesorganen dem Weberschen Gesetz folgt. — Eine Besonderheit bietet die Iris des Schweines insofern, als dort die Pupillenweite kaum durch die Muskelkraft des Sphinkters gegen die antagonisierende Muskelkraft des Dilatators bestimmt wird, sondern sich als Gleichgewicht zwischen Muskelzug (Sphinkter) und elastischen Kräften struktureller Iriselemente darstellt. Auffällig ist die entspannende Wirkung von Adrenalin und l-Noradrenalin auf den tonisierten Sphinkter iridis, ebenso die Entspannung des tonisierten Dilatators durch Ac.Ch.

Man hat es also bei der Regulierung der Pupillenweite mit einem doppelten Antagonismus es zu tun, der einerseits chemisch, anderseits physikalisch bedingt ist. Die Entspannung des durch Ac.Ch. tonisierten Sphinkters wird unter Einfluß von Atropin vermißt!

Zu beachten ist ferner die erhebliche spontane Tonuszunahme des Dilatators iridis vom Rind, ferner die Entspannung des Dilatators iridis durch Adrenalin, wenn das Präparat der Breitseite der querovalen Pupille entnommen ist. Atropin löst die durch Ac.Ch. bewirkte Sphinkter-Zugkraft auffallend träge, d. h. im Vergleich zur Anspannung durch Ac.Ch. Das Analoge gilt für Dihydroergotamin bei Löschung der durch Adrenalin bedingten Anspannung des Dilatator iridis.

Literatur.

[1] Bürgi, S.: Helvet. physiol. Acta **3**, 1 (1945). — [2] Clark, A. J.: J. of Physiol. **64**, 123 (1927/28). — [3] Ducret, S.: Pflügers Arch. **225**, 680 (1930). — [4] Hess, W. R.: Helvet. physiol. Acta **7**, 178 (1949). — [5] Hess, W. R.: Helvet. physiol. Acta **8**, C 49 (1950). — [6] Hess, W. R., u. W. Koella: Z. exper. Med. **116**, 431 (1950). — [7] Hess, W. R., W. Koella u. Th. Szabo: Z. exper. Med. **115**, 481 (1950). — [8] Joseph, R.: Proc. Amer. Soc. Pharmacol. (1916). — J. Pharmacol. **9**, 358 (1917). — [9] Koella, W., u. J. C. Rüegg: Z. exper. Med. **118**, 390 (1952). — [10] Meesmann, A.: Graefes Arch. **152**, 335 (1952). — [11] Poos, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **126**, 307 (1927). — [12] Rickenbacher, O.: Acta anat., Basel **13**, 48 (1953). — [12] Rüegg, J. C. u. Hess, W. R.: Helvet. physiol. Acta **11**, Fasc. 2 (1953). — [13] Ten Cate, J.: Arch. néerl. Physiol. **6**, 251 (1922). — [14] Theiler, K.: Acta anat., Basel **10**, 255 (1950). — [15] Wessely, K.: Klin. Mbl. Augenheilk. **65**, 373 (1920). — Deutsche ophthalmolog. Ges. **42**, 26 (1929).

Prof. Dr. W. R. Hess, Physiologisches Institut der Universität Zürich/Schweiz.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 291—301 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Laboratorium der Sandoz A.G., Basel.

Experimentelle Untersuchungen über die Beeinflussung renaler Ischämien durch Hydergin*.

Von

E. Rothlin, A. Cerletti und R. Bircher.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. April 1953.)

Bekanntlich gehören die Nieren zu den Organen mit äußerst hoher Durchblutung. Da bis zu 30% der vom Herzen geförderten Blutmenge den Renalkreislauf passieren, ergibt sich z. B. beim Menschen, daß innert 24 Std weit über 1000 l Blut ihren Weg durch das weitverzweigte Strombett der Nieren nehmen. Der Sinn dieser enormen Blutversorgung ist natürlich nicht allein im Organ selber, d. h. in seinen eigenen nutritiven Bedürfnissen zu finden, sondern in der lebenswichtigen Rolle, welche die Nieren als Organe der Harnbereitung spielen. Für ihre mannigfachen Leistungen als Exkretionsorgan (Filtration, Rückresorption, Sekretion) bedarf die Niere einer beträchtlichen Versorgung mit Sauerstoff. Hinzu kommt, daß der komplexe Biochemismus des Nierenparenchyms nicht nur im Dienste der Harnbereitung und Ausscheidung steht, sondern auch Funktionen dient, welche die Niere zu einem Regulationsorgan mit humoralen Fernwirkungen — ähnlich einer Drüse mit innerer Sekretion — stempeln.

Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang der Einfluß renaler Faktoren auf das Zirkulationssystem. Ohne diesen sehr weit gewordenen Problemkreis näher berühren zu wollen, kann mit Sicherheit gesagt werden, daß die Niere geradezu eine Schlüsselstellung in dieser Hinsicht einnimmt. Auf der einen Seite ist ein normaler Ablauf der vielschichtigen Leistungen, welche die Niere durchzuführen hat, nur durch die abundante, aber trotzdem optimale Blutversorgung gewährleistet. Auf der anderen Seite wirken sich renale Funktionsstörungen dermaßen auf das gesamte Kreislaufsystem aus, daß die Niere ihrerseits wieder davon in Mitleidenschaft gezogen wird und gleichsam zum Ausgangspunkt einer pathophysiologischen Kettenreaktion werden kann.

Die pathogenetische Bedeutung renaler Ischämien ist unbestritten und ebenso das Bedürfnis, mit adäquaten Maßnahmen therapeutisch dagegen wirken zu können. Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über Wirksamkeit und Wirkungscharakter hydrierter Mutter-

* Herrn Prof. Otto Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

kornalkaloide haben wir daher schon vor einigen Jahren der Frage Beachtung geschenkt, inwiefern verschiedene renale Ischämieformen im Tierexperiment auf pharmakodynamischem Wege beeinflußt werden können. Zum Teil wurden die Ergebnisse in vorläufiger Form publiziert[3]. In weiteren Untersuchungen konnten zwar die pharmakodynamischen Befunde betreffend die Beeinflußbarkeit bzw. Hemmbarkeit der Ischämie voll bestätigt werden. In bezug auf Fragen der renalen Ischämiegenese stießen wir jedoch teilweise auf Diskrepanzen zwischen Ergebnissen der morphologischen und funktionellen Analyse. Dies betrifft speziell die Frage der corticomedullären Blutverteilung im Sinne des Trueta-Mechanismus einerseits, sowie jene der funktionellen Bedeutung arteriovenöser Kurzschlüsse andererseits. Nachdem unsere diesbezüglichen Resultate unlängst in einer speziellen Arbeit[14] mitgeteilt wurden, soll an dieser Stelle über das Ergebnis der histologischen Analyse von annähernd 100 in vivo mit Tusche injizierten Nieren berichtet werden.

Methodik.

Die Untersuchungen wurden an Kaninchen durchgeführt, wobei meistens Urethan, selten Urethan/Chloralose kombiniert, als Narkoticum verwendet wurde. Zur Darstellung des Füllungszustandes der Nierengefäße wurde unverdünnte Tusche benutzt, die durch eine Metallkanüle, welche via Aorta abdominalis bis in die Nähe des Abgangs der Nierenarterien heranreichte, in Mengen von je 2 cm^3 injiziert wurde. Die renalen Ischämien wurden auf folgende Weise erzeugt:

a) Anlegen eines sogenannten Tourniquet, d. h. Drosselung einer Hinterextremität mit galvanisiertem Eisendraht, der oberhalb des Tuber ischiadicum angelegt und für 4—5 Std liegen gelassen wird. Innerhalb $\frac{1}{4}$—$\frac{1}{2}$ Std nach Abnahme des Tourniquet erfolgt die Tuscheinjektion.

b) Verschluß der freigelegten und kanülierten Trachea während 40—70 sec, wodurch es zu allgemeiner Asphyxie kommt. Tuscheinjektion kurz vor Aufhebung der Asphyxie.

c) Elektrische Reizung der die Arteriae renales begleitenden Nervenfasern des Plexus renalis mittels versenkbaren Platinelektroden und Harvard-Induktorium. Auf der Höhe der Reizwirkung wird Tusche injiziert.

d) Intravenöse Injektion von 10—30 γ Adrenalin innerhalb 30 sec, unmittelbar gefolgt von intraarterieller Tuscheinjektion.

Mit den erwähnten Verfahren wurden sowohl Versuche an unvorbehandelten Tieren als Kontrolle sowie Versuche nach vorheriger Hydergingabe durchgeführt (0,1 mg/kg i.v. 10—40 min vor Auslösung der Ischämie). Das Hydergin wurde erst verabreicht, nachdem im Vorversuch die wirksame Intensität der elektrischen Reizung, der Asphyxiedauer oder der Adrenalindosis an Hand der sichtbaren Verkleinerung der Nieren und der Abblassung ihrer Oberfläche bestimmt war. Bei den Tourniquet- bzw. Crush-Versuchen war eine solche Vorprobe nicht möglich.

Sofort nach der Tuscheinjektion wurden die Nieren nach Zuziehen einer vorbereiteten Ligatur um den Nierenstiel exstirpiert und in Formol gebracht. Die fixierten Organe wurden bezüglich der Schwarzfärbung von Oberfläche und Schnittfläche makroskopisch beurteilt und dann in Serienschnitten für die histologische Kontrolle aufgearbeitet.

Ergebnisse.

1. Kontrollversuche ohne Hydergin.

Von insgesamt 54 untersuchten Nieren zeigten 42 im makro- und mikroskopischen Bild der Gefäßfüllung eindeutige Ischämiezeichen, wie das in Tab. 1 dargestellt ist. Die injizierte Tusche gelangt nicht oder nur verzögert bis an die Nierenoberfläche, welche bestenfalls schwarz gefleckt wird und daneben blaßgraue Partien aufweist (siehe Abb. 1). Die

Tabelle 1.

Verfahren	A. Kontrollversuche ohne Hydergin					B. Versuche unter Hyderginschutz				
	Anzahl der untersucht. Nieren	Rinden-ischämie	Mark-ischämie	Rinden- und Markischämie	ohne Befund	Anzahl der untersucht. Nieren	Rinden-ischämie	Mark-ischämie	Rinden- und Markischämie	ohne Befund
Tourniquet . .	18	6	1	7	4	6	2	—	—	4
Adrenalin . . .	12	8	—	2	2	14	—	1	—	13
Plexusreizung .	8	2	—	5	1	8	—	—	1	7
Asphyxie . . .	16	3	1	7	5	12	1	2	2	7
		19	2	21			3	3	3	
Total	54		42		12	40		9		31

mikroskopische Untersuchung (siehe Abb. 2) bietet ein recht mannigfaches Bild: Neben der seltenen totalen Ischämisierung von Rinde und Mark finden sich häufiger herdförmige Ischämiezonen, die vor allem in der Nierenrinde zerstreut liegen, aber auch im Mark anzutreffen sind. Nur in einem Teil der Fälle zeigt sich eine gut erhaltene Markfüllung bei gleichzeitiger Ausschaltung weiter Rindenabschnitte aus der Zirkulation, wie das von Trueta et al. beschrieben wurde. Es können aber auch nur die juxtamedullären Glomeruli mit den zugehörigen Gefäßen aus der Zirkulation ausgeschaltet sein, bei relativ guter Durchblutung bzw. Tuschefüllung der distalen Rindenpartien und des Marks, und vereinzelt findet sich mangelhafte Füllung der Markgefäße, während die entsprechenden Rindenpartien gut dargestellt sind. Die Nierenrinden selbst können teils nur Füllung der Vasa afferentia und der Glomeruli aufweisen bei gedrosselter capillarer Durchblutung, und umgekehrt können nur die Capillaren dargestellt sein bei fehlender Füllung der Glomeruli (hierüber siehe weiter unten). In ein und derselben Niere kommen nicht selten die verschiedenen Spielarten der gedrosselten Nierendurchblutung vor, sofern nicht das Organ in toto ischämisch ist.

Eine Zuordnung bestimmter typischer Ischämieformen zu den angewandten gefäßwirksamen Reizen läßt sich nicht durchführen. Über-

haupt darf aus dem Bild der Gefäßfüllung nur mit Vorsicht auf die funktionellen Vorgänge geschlossen werden, welche sich unmittelbar vor der Tuscheinjektion abspielen. So kann z. B. die oben erwähnte Füllung von Rindencapillaren bei vollständigem Ausfall der entsprechenden Glomeruli, wie das besonders in Abb. 3 dargestellt ist, nicht als Ausdruck einer

Abb. 1. Oberfläche (oben) und Schnittfläche (unten) von Kaninchennieren, die während Asphyxie mit Tusche injiziert wurden, und zwar links im Bild ohne und rechts mit Hyderginvorbehandlung.

Zirkulation von der arteriellen Seite (Art. interlobulares) via aglomeruläre Äste in das Capillarsystem gedeutet werden. Vielmehr handelt es sich um eine Rückstauung von venösem Blut aus den großen Venen der Rinden/Markgrenze in die venösen Capillarabschnitte der Rinde, die an sich von der Blutzufuhr völlig ausgeschaltet ist. Im Beispiel der Abb. 4

war die Rindenzirkulation durch Embolisierung der Interlobulararterien mittels feinster Glaskugeln[14] weitgehend ausgeschaltet. Trotzdem ent-

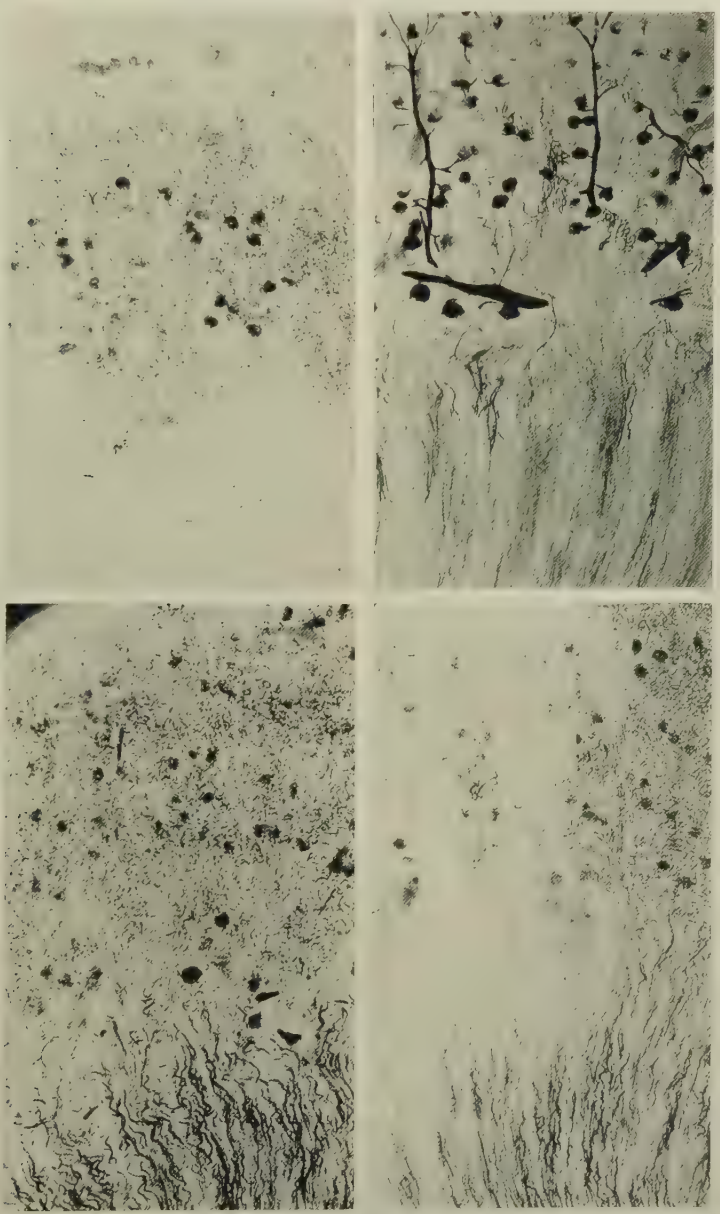


Abb. 2. Beispiele verschied. ischämischer Befunde in den Nieren nach Asphyxie (ob. links), Tourniquet (ob. rechts), Adrenalin (unt. links) und Reizung des Plexus renalis (unt. rechts). Vgl. hierzu Abb. 5.

halten einzelne Rindenabschnitte Tusche infolge retrograder Füllung von Rindenvenen und entsprechender venöser Capillarbezirke.

Insgesamt ergibt sich aber, daß mittels Tuschedarstellung des intrarenalen Gefäßnetzes in mehr als drei Viertel der Fälle bei den von uns angewandten Verfahren Zeichen von Ischämie festzustellen sind. Mit diesem Befund als Vergleichsgrundlage wurden bei medikamentös vorbehandelten Tieren gleiche Versuche wiederholt.

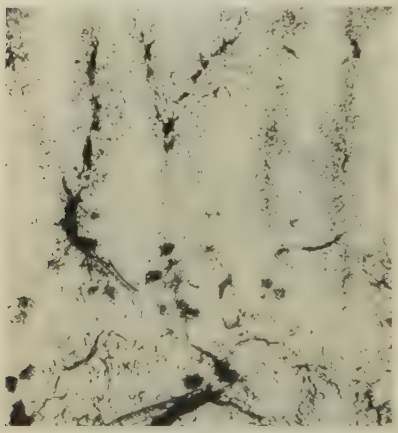


Abb. 3.

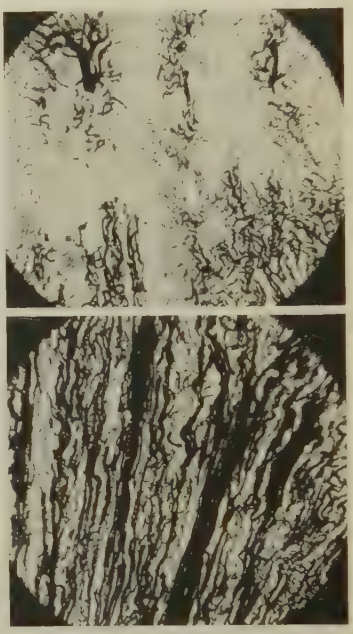


Abb. 4.

Abb. 3. Partielle Füllung von Rindencapillaren (und -venen) bei sonst ausgeprägter Ischämie mit vollständigem Ausfall der Glomerulusfüllung bei Reizung des Plexus renalis. Die Verteilung bzw. Anordnung der gefüllten Capillarabschnitte ist typisch für den venösen Anteil der Rindencapillaren und spricht für retrograde Füllung dieser Gefäße.

Abb. 4. Korrespondierende Ausschnitte aus Rinde und Mark einer Kaninchenniere, deren Interlobularарterien durch wiederholte Injektion von Glaskugeln embolisiert waren. Eine ebenfalls in vivo vorgenommene Tuscheinjektion zeigt neben gut gefüllten Markgefäßen eine offenkundig retrograd entstandene Füllung von Rindenvenen und -capillaren, analog wie in Abb. 3.

2. Versuche unter Hyderginschutz.

Der Tab. 1 ist zu entnehmen, daß nur bei 9 von 40 Fällen Ischämiezeichen festgestellt wurden, also ein nahezu umgekehrtes Zahlenverhältnis positiver und negativer Befunde im Vergleich zu den Kontrollversuchen. Die Wirksamkeit des Hydergin als Schutz gegen die verschiedenen vasoconstrictorischen Einflüsse zeigt sich ausdrücklich schon während der Tuscheinjektion. Die Nierenoberfläche färbt sich in der Mehrzahl der Fälle innert kürzester Zeit tiefschwarz und das Nierenvolumen verkleinert sich nicht (siehe Abb. 1). Die histologische Untersuchung bestätigt die gute Füllung von Rinden- und Markgefäßen, wie das die Abb. 5 illustriert. In den Fällen, welche noch vereinzelte ischämische

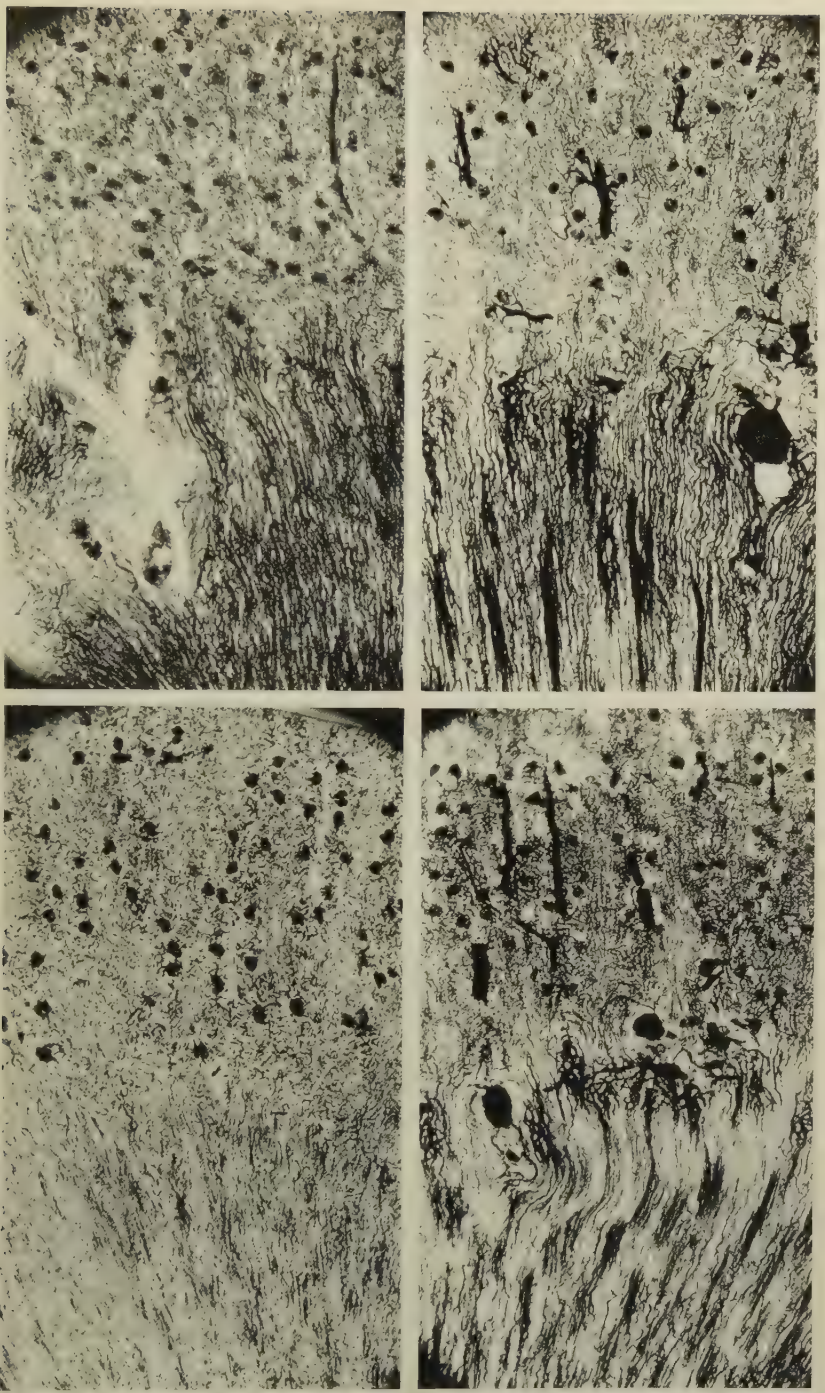


Abb. 5. Tuschedarstellung der Nierengefäße von Kaninchen, die nach Vorbehandlung mit 0,1 mg/kg Hydergin den verschiedenen Ischämie auslösenden Verfahren unterworfen wurden: links oben Tourniquet, rechts oben Asphyxie, links unten Plexusreizung und rechts unten Adrenalin-Injektion. Vgl. hierzu Abb. 2.

Herde aufwiesen, handelt es sich nicht um ein Versagen des Hydergin-schutzes schlechthin, da die entsprechenden Befunde geringfügiger waren, als es dem beobachteten Durchschnitt entspricht.

Die histologische Beurteilung wurde wohl nach qualitativen und quantitativen Kriterien durchgeführt. Um die Gesamtresultate in knapper tabellarischer Form darzustellen, haben wir jedoch in der Tabelle 1 auf die

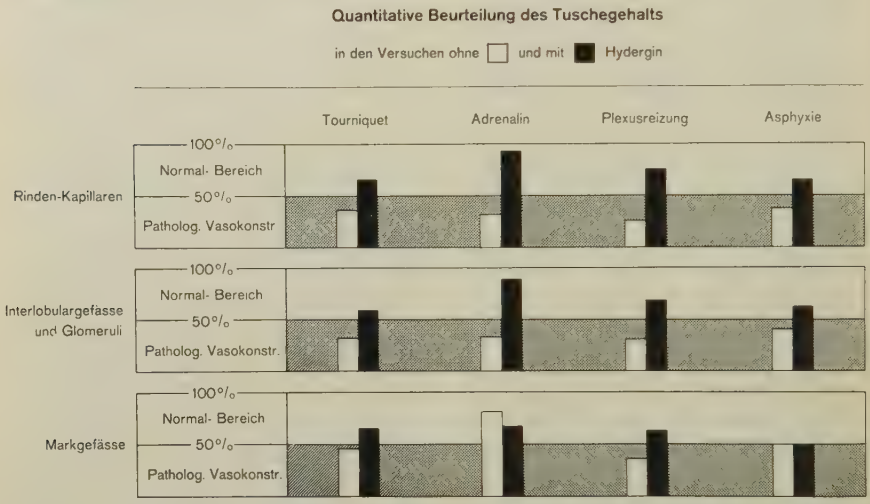


Abb. 6. Die quantitative Beurteilung des Tuschegehalts in den Nieren nach dem im Text angegebenen Verfahren zeigt deutlich, daß für die Hyderginversuche durchweg Werte innerhalb des normalen Bereichs gefunden wurden, während in den Kontrollversuchen mehr oder weniger starke Verminderung des Tuschegehalts festgestellt wurde.

quantitative Differenzierung verzichtet. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse in quantitativer Hinsicht zeigt die graphische Darstellung der Abb. 6, welche dadurch gewonnen wurde, daß der Tuschegehalt in den Gefäßen mit 0, 1 und 2 bezeichnet wurde, wobei 0 = keine Füllung, 1 = mäßige und 2 = starke Füllung bedeutet. Die Befunde wurden addiert und die jeweilige Summe auf einen Wert von $100^0/_0$ bezogen, der das nach dieser Taxation erreichbare Maximum darstellt. Die Tuscheinjektion normaler unbeeinflußter Nieren ergibt nach diesem Vorgehen Werte, die zwischen $50 — 100^0/_0$ liegen. Obwohl ein solches Verfahren nicht mehr als einer angenäherten Schätzung gleichkommt, ergibt sich doch eindeutig, daß in den Versuchen mit Hydergin der Tuschegehalt wesentlich stärker ist. Das gilt vor allem für die Gefäße der Rinde, welche gegenüber constrictorischen Einflüssen bedeutend empfindlicher sind als die Markgefäße.

Diskussion.

Die Reizung des Plexus renalis, Adrenalininjektion, allgemeine Asphyxie und Anlegen eines Tourniquet bedingen in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle, daß nach Tuscheinjektion eine mangelhafte Gefäß-

füllung in den Nieren sichtbar wird, offenbar als Folge constrictorischer Gefäßreaktionen. Es ist zweifellos möglich, unter dem Einfluß der erwähnten Reize Füllungsbilder des Nierengefäßsystems zu erhalten, die weitgehend dem von TRUETA et al. beschriebenen Zustand entsprechen: Ischämie der peripheren und mittleren Rindenzonen bei gleichzeitig erhaltener bzw. verstärkter Füllung der Markgefäße und der juxtamedullären Rindenzone. Dieser Befund ist aber keineswegs regelmäßig anzutreffen, da es häufiger zu fokalen Ischämien kommt, die teils cortical gelagert sind, sehr oft aber streifenförmig sowohl Rinden- als auch Markpartien durchsetzen. Wenn auch selten, so kann die verminderte Gefäßfüllung das Mark stärker als die Rinde betreffen.

Die Befunde von ausgeprägter Markgefäßfüllung bei gleichzeitiger Rindenischämie wurden von TRUETA et al. dahingehend interpretiert, daß eine Umschaltung der intrarenalen Blutverteilung von der Rinde auf das Mark stattgefunden habe. Die kritische Schaltstelle für diesen sogenannten „bypass" sollten die juxtamedullären Glomeruli sein. Je nach Intensität der constrictorischen Reize, welche vornehmlich an der Rinde wirksam werden, sollten größere oder kleinere Mengen des normalerweise durch die Rinde geleiteten Blutes den Weg via juxtamedulläre Glomeruli ins Vasa recta-System des Marks nehmen. Wenn derartige Änderungen der intrarenalen Blutverteilung sich tatsächlich abspielen, so müssen sie auch hämodynamisch erfaßbar sein. Unsere diesbezüglichen Untersuchungen[14] zeitigten jedoch Ergebnisse, welche die Existenz des „TRUETA-Mechanismus" bezweifeln lassen. Eine Reihe anderer Autoren ist im Verlauf der letzten Jahre zur gleichen Schlußfolgerung gelangt[1, 2, 5–11, 16–18]. Es erhebt sich daher die Frage, wie man den morphologischen Befund eines „TRUETA-Phänomens" interpretieren soll. Nach allgemeiner Erfahrung ist es so, daß die Gefäße der äußeren Rindenschichten der Niere gegenüber constrictorischen Reizen empfindlicher sind und rascher und stärker ischämisch werden als in den marknahen Gebieten, durch welche gegebenenfalls noch eine geringe Blutströmung stattfindet, während die Rinde bereits anämisch ist. Die kleine Restströmung, welche das Vasa recta-System des Marks noch erreicht, kann zur Tuschedarstellung dieser Gefäße völlig ausreichen, zumal die Gefäße des Marks zu einem großen Teil weitlumig und dünnwandig sind und keinen großen Füllungsdruck voraussetzen. Hinzu kommt, daß unter dem Einfluß der verschiedenen Eingriffe, mit welchen die renale Vasoconstriction in Gang gebracht wird, der Venendruck sich zum Teil beträchtlich erhöht, wodurch die Füllung der Markgefäße zusätzlich verstärkt wird. Dies alles fördert das Bild einer reichen Markdurchblutung, die aber in Wirklichkeit gar nicht vorhanden ist. Gute Gefäßfüllung allein ist noch kein Beweis für vermehrte Durchblutung, und die funktionelle Analyse der Nierendurchblutung konnte die theoretisch sehr

interessante Vorstellung nicht bestätigen, wonach das Nierenmark als „Kurzschluß" für die Corticalzirkulation dienen kann[19].

Für die Frage, inwiefern mittels pharmakodynamischer Maßnahmen dem Zustandekommen renaler Ischämiezustände entgegengewirkt werden kann, sind die soeben diskutierten Überlegungen nicht von primärer Bedeutung. Wesentlich ist die Feststellung, daß es in der Mehrzahl der Fälle gelingt, durch medikamentöse Prophylaxe die Ausbildung renaler Ischämien stark zu hemmen, und zwar unabhängig davon, ob dieselben durch humorale oder neurogene Faktoren ausgelöst werden. Wir haben in unseren Versuchen das aus den 3 hydrierten Mutterkornalkaloiden Dihydroergocornin, -kryptin und -cristin zusammengesetzte Hydergin verwendet. Die einheitlich angewandte Menge von 0,1 mg kg intravenös ist für Kaninchen als kleine Dosis zu bewerten, da sie nur $^1/_{300}$ der LD^{50} ausmacht. Hydergin ist imstande, die verschiedenartigen, durch reflektorische, neurogen-sympathische bzw. adrenergische Reize erzeugten Gefäßdrosselungen in Nierenrinde und -mark zu verhindern. Die Unterdrückung der Adrenalinischämie durch Dihydroergotamin wurde von Corelli[4] in ähnlicher Weise wie in den vorliegenden Versuchen nachgewiesen.

Im Gegensatz zur Splanchnicotomie vermag die pharmakodynamische Prophylaxe nicht nur die Entwicklung der reflektorisch und asphyktisch bedingten Ischämieformen hintanzuhalten, sondern auch die humoral ausgelöste Minderdurchblutung der Niere zu verhindern. Die unmittelbare Wirkung des Hydergin auf den normalen, d. h. nicht spastisch verengten Nierenkreislauf ist wenig auffällig, da kaum eine gefäßerweiternde Wirkung nachweisbar ist. Dies ist aber an der Niere in typischer Weise auch der Fall für viele andere Pharmaka mit spezifischen vasodilatierenden Eigenschaften, wie z. B. Imidazolpräparate, Nicotinsäurepräparate, Adenosintriphosphorsäure usw. Wir haben eine größere Zahl derselben in bezug auf ihre renale Gefäßwirkung untersucht, und es zeigt sich immer wieder, daß unter physiologischen Verhältnissen bis auf wenige Ausnahmen keine signifikante Durchblutungssteigerung damit erzielt werden kann[15].

Beim Menschen hat gewöhnlich eine einmalige Injektion von 0,1 bis 1,0 mg Hydergin eine vorübergehende Herabsetzung des Nierendurchflusses (PAH-Clearance) zur Folge. Bei mittlerer Hydergin-Dosis (0,3 mg intramaskulär oder intravenös) kommt meistens dieser Wert nach 40 bis 50 min zum Ausgangspunkt zurück, obschon eine Blutdrucksenkung weiter besteht[12]. Im chronischen Versuch bei Hypertonikern stellte Reubi[13] fest, daß nach einer Dauerbehandlung mit Hydergin-Tropfen und -Injektionen der renale Gefäßwiderstand bei 7 von 9 Patienten um Werte von 12—32% abnahm. Wie schon eingangs erwähnt wurde, sind die Nieren physiologischerweise äußerst reichlich durchblutet und diese

Normalverhältnisse dürften ein Optimum darstellen, welches es medikamentös nicht zu ändern gilt. Ganz andere Bedingungen liegen vor, wenn durch verschiedenartige Einflüsse das renale Gefäßsystem gedrosselt ist. Die diesbezüglich erhobenen tierexperimentellen Befunde zeigen, daß durch frühzeitige medikamentöse Eingriffe die Nierendurchblutung weitgehend gebessert werden kann. Es ist bekannt, daß renale Ischämiezustände, auch leichter Art, Progressionstendenz zeigen können und sich gegebenenfalls allzurasch in schwer reversibler Form fixieren. Eine medikamentöse Beeinflussung hat daher vor allem als Frühbehandlung Aussicht auf Erfolg. Die weitreichende pathogenetische Bedeutung renaler Durchblutungsstörungen läßt es somit als gerechtfertigt erscheinen, selbst nur auf Verdacht hin eine entsprechende medikamentöse Prophylaxe oder Therapie einzuleiten.

Zusammenfassung.

An Kaninchennieren werden durch verschiedene Verfahren (allgemeine Asphyxie, Reizung des Plexus renalis, Adrenalininjektion, Extremitätenabschnürung) Ischämien ausgelöst und mit Hilfe von in vivo durchgeführten intraarteriellen Tuscheinjektionen makro- und mikroskopisch analysiert. Die vergleichende Beurteilung von Versuchen an Tieren mit und ohne Vorbehandlung durch hydrierte Mutterkornalkaloide (Hydergin) ergibt eine eindeutige Schutzwirkung des Hydergin gegen Ischämien verschiedener Genese.

Literatur.

[1] Bergstrand, A.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. **1**, 320 (1949). — [2] Block, M. A., K. G. Wakim and F. C. Mann: Fed. Proc. **10**, 16 (1951). — [3] Cerletti, A., R. Bircher u. E. Rothlin: Helvet. Physiol. Acta **7**, C 7 (1949). — [4] Corelli, D.: Rass. Neurol. veg. **8**, 18, 25 (1950). — [5] Goodwin, W. E., R. D. Sloan and W. W. Scott: J. Urol. **61**, 1010 (1949). — [6] Houck, C. R.: Fed. Proc. **9**, 63 (1950). — Amer. J. Physiol. **167**, 523 (1951). — [7] Insull jr., W., I. G. Tillotson and J. M. Hayman jr.: Amer. J. Physiol. **163**, 676 (1950). — [8] Kahn, J. R., L. T. Skeggs and N. P. Shumway: Circulation **1**, 445 (1950). — [9] Moyer, J. H., H. Conn, K. Markley and C. F. Schmidt: Amer. J. Physiol. **161**, 250 (1950). — [10] Oleesky, S.: J. Physiol. **111**, 61 P (1950). — [11] Palmlöv, A.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. **1**, 308 (1949). — [12] Reubi, F.: Helvet. med. Acta **16**, 297 (1949); **17**, Suppl. 26 (1950). — [13] Reubi, F.: Helvet. med. Acta **19**, 29 (1952). — [14] Rothlin, E., u. A. Cerletti: J. Mt. Sinai Hosp. **19**, 138 (1952). — [15] Rothlin, E.: Unveröffentlichte eigene Ergebnisse. — [16] Scher, A. M.: Amer. J. Physiol. **167**, 539, 824 (1951). — [17] Schlegel, J. U., and J. B. Moses: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **74**, 832 (1950). — [18] Study, R. S., and R. E. Shipley: Amer. J. Physiol. **159**, 592 (1949). — [19] Trueta, J., A. E. Barclay, P. M. Daniel, K. J. Franklin and M. M. L. Prichard: Studies of the renal circulation. Oxford: Blackwell 1947.

Prof. Dr. E. Rothlin,
Pharmakologisches Laboratorium der Sandoz A.G., Basel/Schweiz.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 302—309 (1953).

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Innsbruck.

Analgetika und Darmmotorik.

III. Zum Mechanismus der Peristaltik*.

Von

O. Schaumann, K. Jochum und H. Schmidt.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. März 1953.)

Trendelenburg hat in seiner grundlegenden Arbeit den komplizierten Ablauf des peristaltischen Reflexes in klassischer Weise beschrieben.

Nach seinen Versuchsergebnissen verläuft die Peristaltik in folgenden Phasen: 1. Durch den Reiz des steigenden Füllungsdruckes tritt eine Verkürzung der Längsmuskulatur (LM) ein bei gleichzeitiger Erschlaffung der Ringmuskulatur (RM). Dabei zeigt am oralen Ende des Darmstückes der LM den geringsten, der RM den höchsten Tonus. 2. Bei einer kritischen Druckschwelle entsteht am oralen Ende des Darmstückes eine Kontraktion der RM, die als lokalisierter Kontraktionsring gegen das aborale Ende abläuft. Gleichzeitig wird oral von der Kontraktionswelle der RM die Kontraktion der LM ausgelöscht. 3. Nach Ablauf der peristaltischen Welle verliert auch der RM seinen Tonus, so daß für kurze Zeit beide Muskelschichten erschlafft sind. 4. Mit wieder zunehmender Füllung wiederholt sich die 1. Phase und eine neue peristaltische Welle setzt ein.

Der Ablauf des Peristaltikreflexes ist somit durch die Versuche Trendelenburgs in seinen Einzelheiten festgelegt worden.

Dagegen ist über den Mechanismus des zu dem geordneten Ablauf notwendigen Zusammenspiels der beiden Muskelschichten noch wenig bekannt. Trendelenburg selbst schließt sich auf Grund seiner Beobachtungen der Meinung früherer Autoren an, die in der Peristaltik einen nervös gesteuerten Vorgang sehen, dessen nervöse Elemente in dem zwischen den beiden Muskellagen gelegenen Auerbachschen Plexus zu suchen sind.

Während des Ablaufes der peristaltischen Welle verhalten sich LM und RM wie echte Antagonisten: Kontraktion des einen führt zu einer aktiven Erschlaffung des anderen. Für das gleiche Wechselspiel an der quergestreiften Muskulatur ist der Mechanismus der reziproken Innervation infolge der wesentlich günstigeren anatomischen und elektrophysiologischen Bedingungen weitgehend geklärt. Für die weitaus komplizierteren Verhältnisse am Darm mit seinem eng verflochtenen nervösen Plexus ist ein ähnliches analysierendes Vorgehen wohl kaum möglich. Hier hat derzeit nur eine pharmakodynamische Analyse Aussicht

* Herrn Prof. O. Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

auf Erfolg. Nun haben wir für die glatte Muskulatur 2 nervöse Gegenspieler: Den am Darm kontraktionserregenden *cholinergen* Parasympathicus und den hier hemmenden adrenergen Sympathicus. Es ist daher naheliegend und verlockend, das ganze komplizierte Geschehen bei der Peristaltik auf ein Wechselspiel dieser beiden Antagonisten zurückzuführen.

An der cholinergen Natur kontraktionserregender Reize an der RM dürften Zweifel wohl kaum bestehen. Daß auch die in der ersten Phase der Peristaltik auftretende Tonuserhöhung der LM nervösen Ursprungs sein dürfte, darauf soll weiter unten noch eingegangen werden.

Für die Ansicht, daß es sich bei der Erschlaffung des jeweiligen Antagonisten um einen aktiven adrenergen Vorgang handelt, kann vor allem folgender Versuch als Stütze dienen.

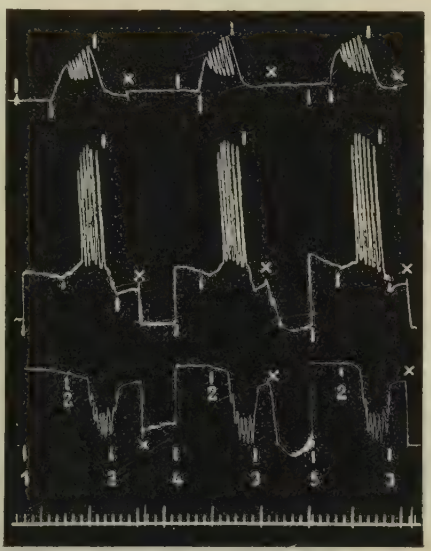


Abb. 1. Meerschweinchen-Dünndarm, Badinhalt 50 cm³. Oben: Volumschreibung. Mitte: Ringmuskel; Hebelvergrößerung 10fach. Unten: Längsmuskel; Hebelvergrößerung 1,8fach. *1* Acetylcholin 0,6 γ, *2* Innendruck auf 4,5 cm Wasser erhöht, *3* Innendruck aufgehoben, *4* Acetylcholin 2,5 γ, *5* Acetylcholin 5,0 γ. × = Auswaschen. Die anfängliche scheinbare Verkürzung der RM dürfte mechanisch durch Anspannung der LM bedingt sein; vgl. auch die verschiedene Hebelübersetzung und die Höhe der wirklichen RM-Kontraktionen bei der Peristaltik.

Setzt man in der Versuchsanordnung nach Trendelenburg bei leerem drucklosem Darm eine kleine Menge Acetylcholin der Badflüssigkeit zu, so daß eine submaximale Kontraktur der vorher tonuslosen LM erfolgt, und erhöht man nun den Innendruck, so tritt zunächst eine weitere Tonussteigerung der LM ein, bis an der RM die erste peristaltische Welle einsetzt. Diese über den Darm hinlaufende Kontraktionswelle der RM löscht trotz Anwesenheit des Acetylcholins die Verkürzung der LM vollkommen aus, bis bei Wiederfüllung des Darmes der LM sich von neuem kontrahiert und das Spiel von neuem beginnt. Hebt man nun die Innendrucksteigerung auf, so erlischt in gewohnter Weise die Peristaltik und die LM verkürzt sich wieder unter der Wirkung des während der ganzen Zeit vorhandenen Acetylcholins (Abb. 1). Ganz das gleiche Ergebnis erhält man, wenn man Histamin an Stelle des Acetylcholins der Badflüssigkeit zusetzt. Auch hier aktive Erschlaffung der LM unter der peristaltischen Welle und Wiederkehr der Kontraktion nach Sistieren der Peristaltik durch Drucksenkung (Abb. 2)*.

---

* *Anmerkung bei der Korrektur:* Die gleiche Beobachtung mit Histamin hat bereits Planelles bei seinen „Mutterkornstudien" (Arch. exp. Path. u. Pharmakol. **105**, 38, 1925) ohne Versuch einer Deutung gemacht (vgl. Abb. 3 seiner Arbeit).

Es gibt nur einen körpereigenen Stoff, der fähig ist, noch in kleinsten Mengen die Acetylcholin- bzw. Histaminwirkung an der glatten Muskulatur auszulöschen, das Sympathin I, das nicht nur am Darm, sondern auch am Bronchialmuskel den durch Acetylcholin bzw. Histamin verursachten Krampf löst.

Die Erschlaffung der LM in der 2. Phase der Peristaltik ließe sich also folgendermaßen erklären: Die über die RM laufende cholinerge Erregungswelle erregt gleichzeitig adrenerge Neurone, die dem LM des

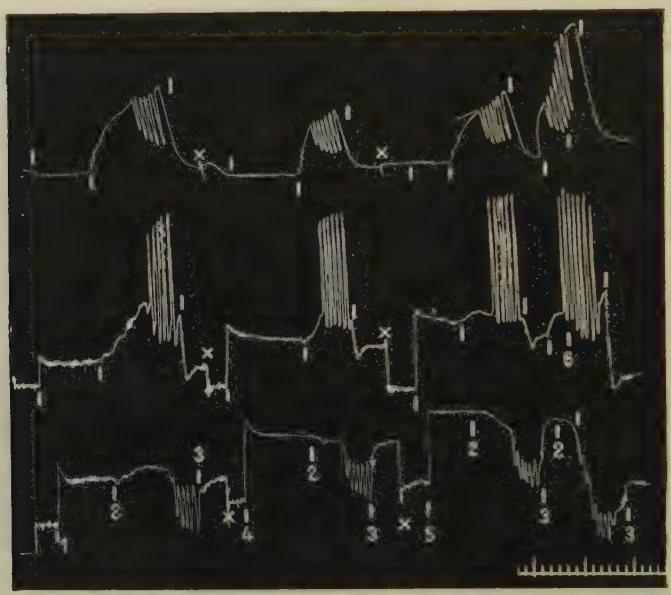


Abb. 2. Allgemeine Bemerkungen siehe Abb. 1. *1* Histamin 1, *2* Innendruck 6 cm, *3* Innendruck aufgehoben, *4* Histamin 3, *5* Histamin 10, *6* Auswaschen bei erhöhtem Innendruck.

gleichen oder benachbarten Segments zugeordnet sind. Durch das in Freiheit gesetzte Sympathin I wird der cholinerge füllungsbedingte Dauertonus des betreffenden LM-Segmentes gelöst, so daß durch die den vorüberlaufenden Reiz überdauernde Anwesenheit des Sympathin I schließlich die gesamte LM erschlafft ist. Nach Zerstörung des Sympathin und Wiederkehr der Darmfüllung überwiegt wieder die cholinerge kontraktionserregende Wirkung an der LM, und das Spiel wiederholt sich.

Die oben angeführten Versuche zeigen also, daß die Erschlaffung der LM als Folge der peristaltischen Welle ein aktiver Vorgang ist und nicht nur rein passiv durch den Wegfall des Dehnungsreizes erfolgt. Letzteres ergibt sich auch aus folgendem: Statt durch den Reiz des Füllungs-

druckes kann man eine Tonuserhöhung der LM auch durch einen *Kältereiz* erzielen. Senkt man bei drucklosem Darm die Badtemperatur rasch von 37 auf 29°, so tritt eine Kontraktion der LM ein, die nach kurzer Zeit durch eine kurze Erschlaffungsphase unterbrochen wird, welche die Folge einer trotz fehlenden Innendruckes über den Darm ablaufenden peristaltischen Welle der RM ist (Abb. 3: 1). In diesem Falle tritt also trotz Fortdauer des Temperaturreizes am drucklosen Darm die Auslöschung der LM-Kontraktion durch die peristaltische Welle ein. Auch hier überdauert die Tonussenkung für kurze Zeit den Ablauf der peristaltischen Welle. Im Anschluß an die vorübergehende Erschlaffungsphase setzt sich die Kontraktion der LM weiter fort, um nach Erreichung eines Maximums langsam wieder abzusinken und schließlich nach einigen Minuten wieder den Ausgangswert zu erreichen. Eine jetzt erfolgende *rasche* Temperaturerhöhung bewirkt ebenfalls einen raschen Tonusanstieg der LM, der hier aber erst auf seinem Höhepunkt von einer oder mehreren peristaltischen Wellen der RM unterbrochen wird, die trotz Fortdauer des Wärmereizes zu einer vollständigen und bleibenden Erschlaffung der LM führen. Der Ablauf dieser „Wärmezacke" erinnert an die Kurvenbilder, die Straub u. Stefansson am Meerschweinchendarm in situ bei länger dauernder Vagusreizung erhielten: Auch hier rascher Tonusanstieg der LM mit mehreren peristaltischen Wellen und ohne bleibende Tonuserhöhung trotz Fortdauer des Reizes.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß nicht nur die Peristaltik, sondern auch die durch Innendrucksteigerung ausgelöste Tonuserhöhung der LM durch Mo und Mo-ähnlich wirkende Analgetika schon in sehr kleiner Dosis und in Parallelität zu ihrer analgetischen Wirkungssteigerung gesenkt bzw. aufgehoben werden kann. Nun hat sich gezeigt, daß auch die Tonussteigerung durch den Kältereiz durch Mo sich noch in einer Verdünnung von 1:10 Mill. völlig aufheben läßt, während man vom 1-Methyl-4-Phenylpiperidin-4-carbonsäureester (Dolantin) entsprechend seiner geringeren analgetischen Wirkungsstärke zum gleichen Effekt etwa die 10fache Konzentration benötigt. Auch die „Wärmezacke" läßt sich durch Mo unterdrücken (Abb. 3).

Die Beobachtung, daß eine durch Acetylcholin bzw. Histamin hervorgerufene Kontraktion der LM durch die peristaltische Welle ausgelöscht wird, spricht eindringlich dafür, daß hier durch einen nervös gesteuerten Vorgang die Beantwortung kontraktionserregender Reize durch die Muskulatur gehemmt wird. Man wird daher auch bei der normalen physiologischen Peristaltik einen ähnlichen Mechanismus für die wechselseitige Beeinflussung der beiden Muskelschichten im Sinne einer adrenergen Erschlaffung der einen bei cholinerger Kontraktion der anderen annehmen können.

Die weitere Beobachtung, daß durch Mo und Mo-ähnlich wirkende Analgetika nicht nur die Tonussteigerung der LM durch Erhöhung des Innendrucks, sondern auch diejenige als Folge eines Temperaturreizes in spezifischer Weise aufhebbar oder zu verhindern ist, dürfte doch dafür sprechen, daß beide Reize über eine nervöse Vermittlung laufen, da nach allen bisherigen Erfahrungen dem Mo eine myogen kontraktionslösende Wirkung nicht zukommt.

Gegen diese Annahme bringen allerdings die schönen Versuche von Feldberg u. Lin sowie Feldberg schwerwiegende Argumente. Feldberg findet, daß bei Nicotindosen, welche nach seiner Ansicht die nervös gesteuerte Peristaltik bereits

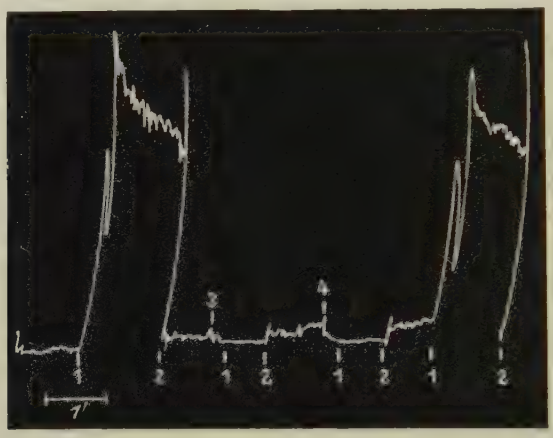


Abb. 3. Meerschweinchen-Dünndarm, Badinhalt 35 cm³, Innendruck 0 cm. *1* Rasches Abkühlen von 37° auf 29°, *2* Spülen mit warmer Fleischlösung von 37°, *3* Morphin 3 γ *4* 25 γ, Dolantin. Nach Morphin bzw. Dolantin bleibt der Temperaturreiz wirkungslos.

lähmen, die Kontraktion der LM auf Druckerhöhung zunächst noch erhalten bleibt, später allerdings auch erlischt; Resultate, die wir nur bestätigen können. Feldberg ist daher geneigt, die Tonussteigerung der LM als direkte myogene Beantwortung des Dehnungsreizes anzusehen. Doch diskutiert er bereits eine andere Möglichkeit: "An other possibility would be to assume that nicotin first stimulates nervecells in the intestinal wall, some of which give rise to short adrenergic neurons, thus releasing adrenaline, which might persist in the tissue spaces for some time." Dieser Mechanismus scheint nach unseren Versuchen vielleicht doch der — wenigstens am Darm — vorherrschende zu sein. Die Beobachtungen von Munro, daß Adrenalin an bestimmten Darmabschnitten unter gewissen Bedingungen auch kontrahierend wirken könne und die Feldberg gegen obige Deutung zu sprechen scheinen, sind doch solche Ausnahmefälle, daß sie als Gegenargument nicht zu schwer wiegen.

Bei der Annahme einer adrenergen Hemmung der RM unter dem Nicotinreiz bleibt die Möglichkeit einer nervösen Auslösung der LM-Kontraktion durch den Dehnungsreiz offen, da diese nach den weiter unten entwickelten Vorstellungen über den Mechanismus der Peristaltik durch den afferenten Dehnungsreiz ohne Zwischenschaltung weiterer Ganglienketten cholinerg ausgelöst wird. Dies wird durch Nicotin zunächst nicht verhindert, da dieses wohl efferente Ganglien, nicht

aber afferente Schaltstellen blockiert und nach Feldberg u. Vartiainen auch die Freisetzung von Acetylcholin durch cholinerge Nervenendigungen nicht verhindert.

Auch die Versuche von Feldberg u. Lin, wonach Lokalanästhetika in kleinen Dosen zwar die Peristaltik, nicht aber die Verkürzung der LM aufheben, könnten gegen eine nervöse Komponente bei der Kontraktion der LM sprechen. Auch hier läßt sich aber zeigen, daß das nicht myotrop wirkende Mo noch in einer Konzentration von weniger als 10^{-7} sofort die trotz Cocain verbleibende LM-Kontraktion löst (Abb. 4).

Abb. 4. Meerschweinchen-Dünndarm, Badinhalt 35 cm³. Von *1–5* Innendruck 2 cm Wasser. *2* Cocain. hydrochlor 150 γ, *3* Morphin 2 γ, *4* Auswaschen, *5* Drucksenkung auf 0 cm.

Eine rein *myogene* Tonuserhöhung als Folge einer mechanischen Dehnung der LM erscheint aber noch aus folgenden Gründen nicht sehr wahrscheinlich:

1. Nach Trendelenburg verteilt sich die Tonuserhöhung der LM bei Erhöhung des Innendrucks nicht gleichmäßig auf die ganze Muskelstrecke, sondern ist am oralen Ende geringer als am aboralen, was rein myogen kaum vorstellbar ist.

2. Die Verkürzungsreaktion der LM ist gegen Sauerstoffmangel relativ empfindlich; sie ist zu einem Zeitpunkt bereits erloschen, in dem muskulär angreifende Stoffe noch wirksam sind.

3. Eine allmähliche mechanische Dehnung durch langsam zunehmenden Zug an der LM führt zu keiner Tonussteigerung.

4. Beim normalen in situ befindlichen Darm dürfte infolge Fehlens von Fixpunkten bei der Füllung wohl kaum eine Dehnung in der Längsrichtung erfolgen.

Gegen eine nervöse Steuerung der RM sind wohl niemals Einwände erhoben worden. Der indirekte Beweis einer aktiven adrenergen Hemmung der RM ließ sich in der gleichen Weise wie für die LM bisher nicht erbringen. Doch ist es wohl keine zu weit gehende Annahme, daß auch die RM einer ähnlichen Steuerung unterliegt wie die LM. Unter dieser Voraussetzung könnte man sich über den Mechanismus der Peristaltik folgende Vorstellung machen, der allerdings vorläufig noch die Mängel, aber auch die Vorteile einer Arbeitshypothese anhaften:

1. Phase: Die afferenten Impulse der Dehnungsreceptoren lösen am LM eine cholinerge Kontraktion und über eine cholinerge präganglionäre Faser gleichzeitig eine adrenerge aktive Hemmung der RM aus. Beide Reize nehmen, möglicherweise durch entsprechende Verteilung der nervösen Elemente, in aboraler Richtung an Stärke zu. Zur Auslösung dieser 1. Phase summieren sich die von einem längeren Darmstück ausgehenden Reize (Abb. 5a).

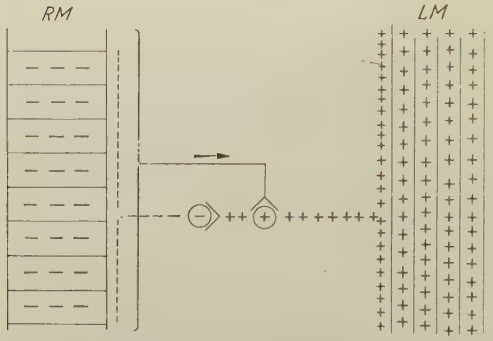


Abb. 5a. 1. Phase: Cholinerge Erregung (+ + + + +) der gesamten LM, adrenerge Hemmung (— — — — —) der gesamten RM. ———— = afferenter Dehnungsreiz.

2. Phase: Die Erregung segmentaler Dehnungsreceptoren bei weiterer Zunahme des Dehnungsreizes führt als afferenter Reiz nun zur cholinergen lokalisierten Kontraktion der RM und gleichzeitig zur adrenergen, aktiven Auslöschung der LM-Kontraktion des gleichen oder benachbarten Segmentes. Entsprechend dem „Gesetz" der Darmbewegung von Bayliss u. Starling könnte am RM dabei die cholinerge Erregung sich auf das benachbarte oralwärts gelegene Segment erstrecken, während am nachfolgenden aboralen Segment der RM eine zusätzliche adrenerge Hemmung der RM erfolgen könnte. Daß die LM-Kontraktion zuerst, also bei geringeren Druckreizen, erfolgt als die lokalisierte RM-Konzentration, hat nach diesen Vorstellungen zweierlei Ursachen: 1. Gehen in der 1. Phase der Peristaltik adrenerge Hemmungsreize zwar an die RM, nicht aber an die LM. 2. Kann man annehmen, daß für die LM-Kontraktion die Dehnungsreceptoren einer längeren Darmstrecke im Sinne einer Summation der Reize zusammenwirken, während für die lokalisierte RM-Kontraktion die Anzahl der Dehnungsreceptoren geringer ist, so daß die Einzelreize stärker sein müssen, um die adrenerg gehemmte RM schließlich zur Kontraktion zu bringen. Aus dem gleichen Grunde ist auch die zweite Phase, die peristaltische Welle der RM, für Lokalanästhetika

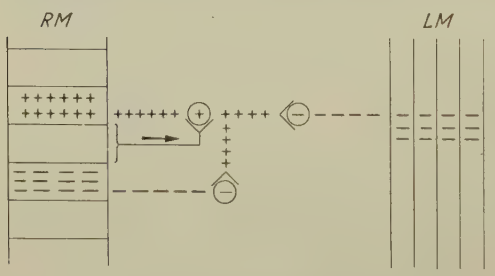


Abb. 5b. 2. Phase; Beginn der Peristaltik; segmentäre cholinerge der RM und adrenerge Hemmung der LM. (Zeichenerklärungen siehe Abb. 5a.)

empfindlicher als die Tonuserhöhung der LM in der ersten Phase (Abb. 5b).

3. Phase: Durch die den vorübergehenden Reiz überdauernde Anwesenheit des Sympathins bleibt die LM in ihrer ganzen von der peristaltischen Welle bestrichenen Ausdehnung noch nachwirkend aktiv erschlafft. Mit der Zerstörung des adrenergen Wirkstoffs nimmt die LM zunächst allmählich wieder ihren Normaltonus an, bis bei weiter bestehendem Füllungsdruck das Spiel von neuem beginnt.

Die den reflektorischen Tonus der LM lösende und peristaltikhemmende Wirkung des Mo und der Mo-ähnlich wirkenden Analgetika würden in diesem Schema ihre Angriffspunkte in den afferenten „Synapsen" haben, die den Dehnungs- oder Temperaturreiz auf den autonomen Mechanismus umschalten, während die Lokalanästethetika bei den geringen peristaltikhemmenden Konzentrationen ihren Angriffspunkt an den Dehnungsreceptoren und nicht an den Leitungsbahnen haben dürften. Diese Annahme wird durch Versuche von Meier und Bein gestützt, nach denen am Ganztier durch Novacain i.v. die von Lunge oder Darm ausgehenden Dehnungsimpulse in afferenten Nervenbahnen bei erhaltener Leitfähigkeit herabgesetzt werden.

Zusammenfassung.

1. Am isolierten Dünndarm des Meerschweinchens in einer modifizierten Versuchsanordnung nach Trendelenburg wird eine durch Acetylcholin oder Histamin bewirkte Kontraktion der Längsmuskulatur durch eine durch Erhöhung des Innendruckes ausgelöste peristaltische Welle der Ringmuskulatur gelöst, um nach Sistieren der Peristaltik wiederzukehren. Dies spricht für eine aktive, adrenerg hemmende Rückwirkung der Ringmuskelkontraktion auf die Längsmuskulatur.

2. Morphin verhindert schon in kleinsten Dosen die durch Temperaturreize verursachte Tonuserhöhung der Längsmuskulatur.

3. Die nach Auslöschung der Peristaltik durch kleine Cocaindosen verbleibende druckbedingte Tonuserhöhung der Längsmuskulatur wird durch Morphin aufgehoben.

Literatur.

Feldberg, W.: J. of Physiol. **113**, 483 (1951). — Feldberg, W., u. J. Lin.: Brit. J. Pharmacol. **4**, 33 (1949). — Feldberg, W., u. A. Vartiainen: J. of Physiol. **83**, 103 (1934). — Jochum, K.: (noch nicht veröffentlicht). — Meier, R. und H. J. Bein: Bull. Schweiz Akad. med. Wiss. **6**, 209 (1950). — Munro, A. T.: J. of Physiol. **112**, 20 P (1950). — Schaumann, O., M. Giovannini u. K. Jochum: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 460 (1952). — Schaumann, O., K. Jochum u. W. Schaumann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **217**, 360 (1953). — Straub, W., u. K. Stefansson: Arch. exp. Path. u. Pharmakol. **185**, 451 (1937). — Trendelenburg, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **81**, 55 (1917).

Prof. Dr. O. Schaumann,
Pharmakognostisches Institut d. Univ. Innsbruck, Peter-Mayr-Str. 1.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 310—314 (1953).

From the Dept. of Pharmacology, School of Tropical Medicine Calcutta, and the Indigenous Drugs Enquiry, I. C. M. R.

The action of Rauwolfia Serpentina on Vasomotor Reflexes*.

By

G. K. Ray, P. K. Roy, S. R. Dasgupta and G. Werner**.

With 3 figures in the Text.

(Eingegangen am 20. März 1953.)

The hypotensive action of Rauwolfia serpentina can only partly be due to its sympathicolytic action as we have shown in a previous paper[1]. We now report on experiments which demonstrate an inhibitory action of Rauwolfia serpentina (R. S.) on vasomotor reflexes. This effect of R. S. obviously contributes to its marked blood pressure lowering action.

The following procedures were used to test the reflex excitability of the vasomotor centre. The carotid sinus reflexes were elicited in cats under chloralose anaesthesia (80 mg/kg intravenously, following an ether induction) by temporary occlusion of the common carotid arteries. At the height of the pressor reflex the intracarotid pressure was raised artificially so that a depressor response was produced. In order to do this a canula was inserted into the external carotid artery after all the other branches of the common carotid artery except occipital artery were tied off. Pressure was applied through the external carotid artery from a pressure bottle filled with Fleisch's solution. A certain amount of this solution entered the general circulation of the animal through the intact occipital artery during this period; the applied pressure was however kept constant throughout the test period and was measured with a mercury manometer connected to the pressure bottle. Usually a pressure of 200 mm. mercury was applied. A carotid sinus depressor effect was produced by that means, which after the release of this back pressure was followed again by a pressor reflex which was maintained until the clamp applied to the common carotid artery was removed. All these procedures were performed simultaneously on both sides. Fig. 1a illustrates the complete cycle performed in this way.

In other experiments, the carotid sinus nerves were stimulated electrically. A shielded electrode was applied to the nerve, an induction coil delivering the stimulating current. Depressor as well as pressor responses were observed in these experiments[8, 2]. The respiration was recorded thoracographically, chemoreceptor reflexes were elicited by means of Potassium cyanide, which was injected in doses of 100 to 200 μg intravenously. Experiments with electric stimulation of the carotid sinus nerve were also performed in rhesus monkeys of a weight between 2, 5—7 kg under Dial anaesthesia (0,5 cc/kg intraperitoneal)***. Heparin was used as anticoagulant in all experiments***. In some experiments pitressin was used in doses of 100 to

* In honor of Prof. O. Loewi on his 80th birthday.

** WHO — Professor of Pharmacology, School of Tropical Medicine, Calcutta.

*** We are grateful to M/s.Hoffmann La Roche, Switzerland, for the generous supply of Liquemin and to Ciba Ltd. for Dial.

500 mU/kg (intravenously) to raise the blood pressure during the hypotensive action of R. S. to its original value. It was considered to be essential for the evaluation of any specific effect on the depressor reflex to maintain the mean arterial pressure constant. We have convinced ourselves in several control experiments that pitressin in these doses does not interfere with depressor reflexes originating from the carotid sinus. S. WRIGHT[11] has also observed that this amount of pituitary hormones does not reduce the effect of depressor reflexes.

R. S. was used either as crude extract of the roots of the Dehra Dun variety (containing 1% alkaloids) in alcoholic solution or as purified total alkaloids isolated from this extract. The alkaloids were administered as hydrochloride in aqueous solution.

Our communication is based on the observations obtained in 15 successful experiments.

Results.

The crude extract of R. S. as well as the total alkaloid fraction produce a marked reduction of the pressor as well as the depressor responses which can be elicited by means of pressure changes within the carotid sinus (fig. 1).

The vasomotor reflex blocking activity of R. S. does not only concern the extent of the pressor and depressor response but affects also the

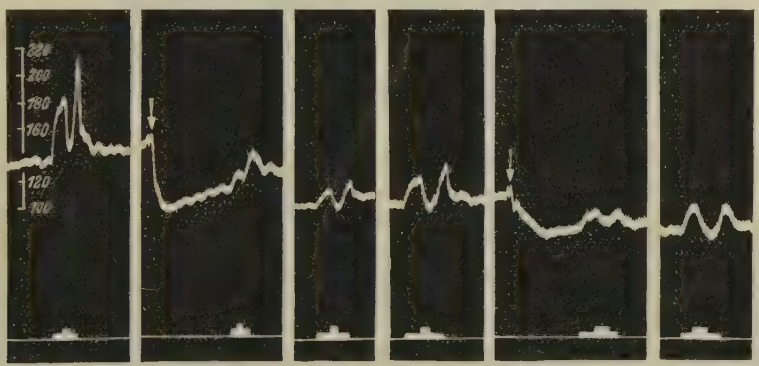


Fig. 1. Cat, 3,1 kg, Chloralose anaesthesia (80 mg/kg). Arterial pressure in mm mercury. The white bars at the bottom indicate the period of occlusion of both common carotid arteries, the super imposed smaller bars represent the time during which a back pressure of 200 mm Hg was applied through a canula inserted into the external carotid artery (s. text). In *b*: at ↓ intravenous injection of 4 mg/kg purified total alkaloids. *c*: 50 minutes after the injection. *d*: 100 minutes after the injection. In *e*: at ↓ intravenous injection of 0,025 cc/kg Total extract of R. S. (1%). *f*: 40 minutes after the injection in *e*. Speed of the record as in fig. 3.

latency of the reflexes considerably. The baro-receptor stimuli have to be applied for longer periods in order to give rise to any systemic pressure changes. We never observed a complete recovery of the carotid sinus reflex in these experiments even after periods of several hours following the administration of either the crude extract or the purified total alkaloids. We were however able to observe constant reactions of the

arterial pressure as a consequence of the baroreceptor stimulation in control experiments over several hours if no drugs or inactive fractions were administered. Fig. 2 shows that the changes of the arterial pressure induced by electric stimulation of the carotid sinus nerve are affected in a similar way as the effects due to mechanical stimulation of the carotid sinus baroreceptors. The carotid sinus nerve of one side gave in this experiment initially a pressure response on electric stimulation. This

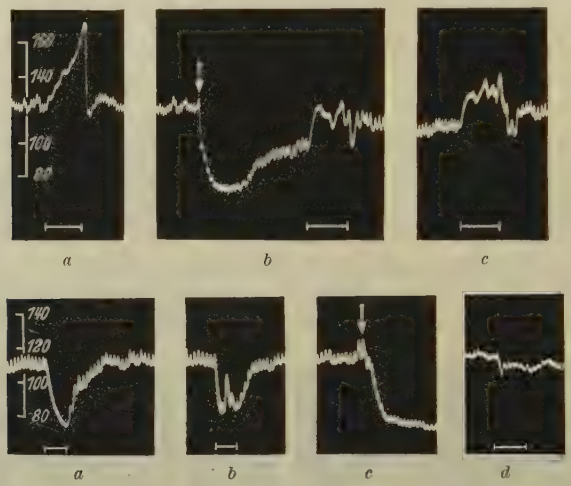


Fig. 2. Cat, 3,5 kg, chloralose anaesthesia. Upper row: Electric stimulation of the left carotid sinus nerve during the periods indicated at the bottom of the records. In *b*: at ↓ Intravenous injection of 6 mg/kg purified total alkaloids. *c*: 30 minutes after the injection. Lower row: 3 hours later, stimulation of the right carotid sinus nerve. 5 minutes before record b, 0,1 cc/kg of an inactive fraction was administered intravenously. In *c*: Injection of 5 mg/kg purified total alkaloids. Between *c* and *d*: 5 minutes interval, 100 mU pitressin were injected twice. In *d*: stimulation of the carotid sinus nerve as before.

response was markedly reduced by a dose of 6 mg/kg total R. S. alkaloids. Three hours later, we obtained in this experiment a depressor response from the carotid sinus nerve of the opposite side. Following the injection of 5 mg/kg total R. S. alkaloids, 100 mU pitressin was administered twice within 5 minutes to raise the blood pressure to its original level. No depressor response was then obtained on electric stimulation of the sinus nerve. In smaller doses of R. S. than those used in this experiment, only the prolongation of the latency of the pressure response is prominent.

It is now generally agreed that pressor responses originating from the electric stimulation of the carotid sinus nerve are due to the excitation of nerve fibres from chemoreceptors; however, the chemoreceptors obviously also contribute to the rise of blood pressure caused by carotid occlusion[6]. In both cases, we find the effects of their stimulation reduced, following the administration of R. S. We were therefore sur-

prised to see that the respiratory as well as the circulatory reflexes caused by the intravenous injection of KCN were not antagonised to an appreciable extent (fig. 3).

We are not in the position to decide at present whether this has anything to do with the existence of 2 types of chemoreceptors as suggested from the specific effect of hexamethonium and tetraethylammonium on their stimulation by acetylcholine

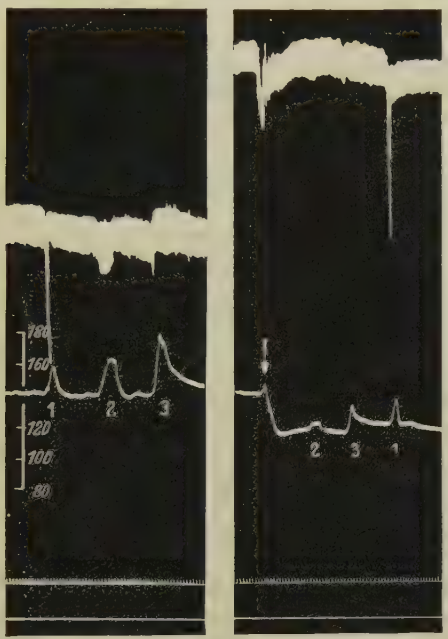


Fig. 3. Arterial pressure and respiration of a cat (2,8 kg, chloralose anaesthesia). At 1: 200 μg KCN (intravenously), At *2:* Occlusion of both common carotid arteries, At *3*: 3 γg adrenaline intravenously, At ↓ :0,1 cc/kg crude Rauwolfia extract (intravenously). (The level of the respiratory record was raised artificially between the left and the right part of the record.) Time signal: 6 sec.

and nicotine, leaving the response to anoxia and KCN unaffected[3, 7]. It is however interesting to note here that ergot alkaloids for which a specific blocking action on vasomotor reflexes has been demonstrated by several authors[4, 5, 9, 11] also do not affect the respiratory response to KCN and redúce the pressor reflex only to such an extent as it is due to their peripheral sympathicolytic action[10].

Sumary.

The crude extract of Rauwolfia serpentina as well as its total alkaloids possesses a blocking action on pressor as well as depressor reflexes originating from the carotid sinus. Respiratory and circulatory reflexes due to stimulation of the KCN-sensitive chemoreceptorsare however not affected in a specific way.

The authors desire to express their sincerest thanks to Mr. A. N. Mookerjee and the other members of the staff of this laboratory for their keen cooperation.

References.

[1] Dasgupta, S. R., G. K. Ray, P. K. Roy and G. Werner: (in press). — [2] Douglas, W. W., I. R. Innes and H. W. Kosterlitz: J. of Physiol. **111**, 215 (1950). — [3] Douglas, W. W.: J. of Physiol. **118**, 373 (1952). — [4] v. Euler, U. S., and C. G. Schmiterlow: Acta physiol. scand. **8**, 122 (1944). — [5] Heymans, C., and P. Regniers: Arch. internat. Pharmacodynamie **36**, 116 (1929). — [6] Landgren, S., and E. Neil: Acta physiol. scand. **23**, 152 (1951). — [7] Moe, G. K., L. R. Capo and B. Peralta: Amer. J. Physiol. **153**, 601 (1948). — [8] Neil, E., C. R. M. Redwood and A. Schweitzer: J. of Physiol. **109**, 259 (1949). — [9] Rothlin, E.: Arch. internat. Pharmacodynamie **27**, 458 (1923). — [10] Sutton, G. C., A. Cerletti and M. Taeschler: Arch. internat. Pharmacodynamie **87**, 393 (1950). — [11] Wright, S.: J. of Physiol. **69**, 31 (1930).

Prof. Dr. G. Werner, Dept. of Pharmacology, School of Tropical Medicine Calcutta, and the Indigenous Drugs Enquiry, I. C. M. R.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 315—332 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
(Direktor: Professor Dr. Dr. A. W. Forst).

Wirkung von Strophanthin auf Kontraktionskraft und Sauerstoffverbrauch des Herzstreifens der Ratte* **.

Von
Melchior Reiter.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 18. Dezember 1952.)

Eine Reihe von Untersuchungen über die Einwirkung herzwirksamer Glykoside auf den Stoffwechsel von Herzmuskelschnitten von Ratten (Lévy, Libert u. Schwob 1946; Rothlin u. Schoelly 1950), Meerschweinchen (Wollenberger 1947a) und Katzen (Finkelstein u. Bodansky 1948) führten zu dem Ergebnis, daß die Sauerstoffaufnahme dieser Gewebe durch bestimmte Konzentrationen an Glykosid erheblich gesteigert wird. Auf Grund dieser Befunde wird die Frage erörtert, ob die inotrope Glykosidwirkung durch eine Vergrößerung der oxydativen Energieproduktion zustande kommt. Eine solche Erklärung der inotropen Glykosidwirkung würde aber im Widerspruch stehen zu der nach Untersuchungen am ganzen Herzen gewonnenen Auffassung, wonach durch den Einfluß der Herzglykoside lediglich der während der Hypodynamie erniedrigte Wirkungsgrad des Muskels verbessert wird. Um die in vitro erhaltenen Befunde in ihrer Bedeutung für den Mechanismus der inotropen Wirkung beurteilen zu können, schien es mir notwendig, diese Versuche unter Bedingungen zu wiederholen, bei denen gleichzeitig die Wirkung der Herzglykoside auf die Kontraktionsfähigkeit gemessen werden konnte. Nur so ist man in der Lage, in jedem Fall eine Beziehung aufzustellen zwischen dem Ausmaß der inotropen Wirkung und etwaigen Veränderungen des oxydativen Stoffwechsels.

Methodik.

Die Messung der Sauerstoffaufnahme erfolgte nach der direkten manometrischen Methode von Warburg. Der Gasaustausch wurde in der üblichen Weise durch ständiges Schütteln des Atmungsgefäßes im Thermostaten mit einer Frequenz von 120 Ausschlägen pro Minute gewährleistet. Dadurch konnte das sehr umständliche System der Gaszirkulierung vermieden werden, das Weeks u. Chenoweth (1952) für

* Herrn Professor Otto Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

** Auszugsweise vorgetragen auf der 19. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Göttingen am 5. August 1952.

ein feststehendes Atmungsgefäß angegeben haben, mit dem sie Atmung und mechanische Aktivität der Zwerchfellmuskulatur gleichzeitig registrierten.

Die isometrischen Kontraktionen wurden photographisch registriert in der Weise, wie sie von McKeen Catell u. Gold (1938) für die Untersuchung der inotropen Wirkung von Digitalisglykosiden an Herzmuskelstreifen und Papillarmuskeln eingeführt worden ist.

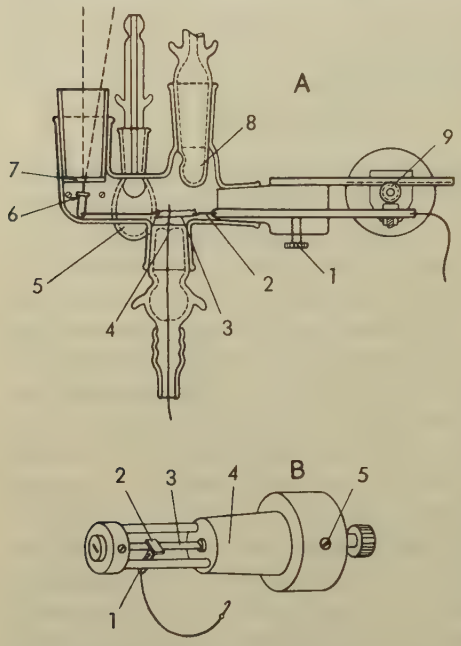


Abb. 1. Atmungsgefäß zur gleichzeitigen Messung von Sauerstoffverbrauch und Kontraktionskraft von Herzmuskelstreifen. Halbschematische Darstellung des Gefäßes (*A*) und des isometrischen Hebels (*B*). Beschreibung im Text.

Beide Methoden lassen sich zu gleichzeitig erfolgenden Messungen am selben Herzmuskelstreifen vereinigen bei Verwendung eines entsprechend konstruierten Atmungstroges, der in Abb. 1 A halbschematisch dargestellt ist*.

In ihm ist der Muskelstreifen (*3*) auf der einen Seite an der hakenförmigen Elektrode (*2*), die mittels eines Feintriebes (*9*) in ihrer Lage verändert werden kann, befestigt und hängt auf der anderen Seite mit einem Haar an dem isometrischen Hebel (*6*). Die zweite Reizelektrode (*4*) wird durch einen Glasschliff vom Boden des Gefäßes her an den Muskel herangeführt. An der Seite des Gefäßes befindet sich eine Aussackung (*5*) zur Aufnahme der Strophanthinlösung, die von dort aus während des Versuches in den Hauptraum gekippt werden kann. Für die Aufnahme der zur Absorption der Kohlensäure bestimmten Kalilauge ist der Glasschliff des Manometers in entsprechender Weise nach unten hin verlängert (*8*).

Für den freien Durchtritt des am Spiegel des isometrischen Hebels reflektierten Lichtstrahls befindet sich oberhalb dieses Spiegels im Atmungstrog ein Schliff zur Aufnahme eines Glaskonus, an dem unten eine planparallele Glasplatte (*7*) aufgekittet ist.

Der isometrische Hebel (*1*, Abb. 1 B) geht von einem gespannten Metallband (*3*) aus, auf dem ein Spiegel (*2*) aufgekittet ist. Das Metallband (*3*) hängt in einem Spannrahmen, der an einem Hartgummikonus (*4*) befestigt ist. Durch diesen Konus wird in Verlängerung des Metallbandes ein Stift geführt, der durch die Stellschraube (*5*) in seiner Lage fixiert ist, wodurch das Metallband (*3*) in Spannung gehalten wird.

---

* Konstruktion und Herstellung der mechanischen Teile verdanke ich dem Mechanikermeister unseres Instituts, Herrn Karl Heuwing. Die Glasbläserarbeiten wurden von Herrn Wolf i. Firma Bender und Hobein, München, ausgeführt.

Der Konus (*4*) paßt in einen Glasschliff, der sich an der Seite des Atmungsgefäßes im rechten Winkel zu dessen Längsachse befindet (siehe Abb. 2).

Auf der anderen Seite des Atmungsgefäßes befindet sich gegenüber dem eben beschriebenen Glasschliff ein zweiter, in dem ebenfalls ein Hartgummistopfen eingepaßt ist. An dem aus dem Glasschliff herausragenden Teil dieses Stopfens ist eine Leichtmetallschiene befestigt. Sie führt unterhalb des Atmungsgefäßes zu dem Außenteil des den isometrischen Hebel führenden Hartgummikonus und wird an diesem festgeschraubt. Dadurch, daß die Schiene von unten her dem Boden des

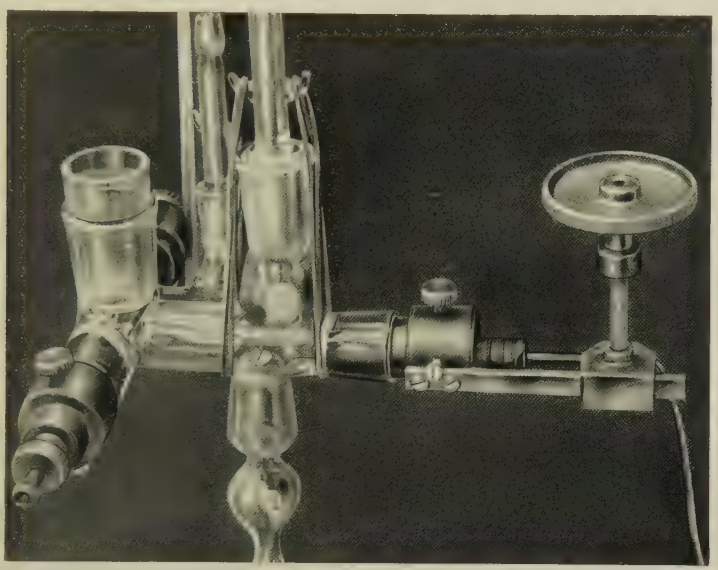


Abb. 2. Photographische Abbildung des montierten Gefäßes zur gleichzeitigen Messung von Sauerstoffverbrauch und Kontraktionskraft.

Atmungsgefäßes anliegt, werden beide Hartgummistopfen und damit der isometrische Hebel in ihrer Lage fixiert (Abb. 2).

Material: Die beiden Stopfen, die den isometrischen Hebel tragen bzw. fixieren, sowie der die Elektrode (*2*) führende Stopfen bestehen aus Hartgummi. Der Unterschied im Ausdehnungskoeffizienten zwischen Hartgummi und Glas ist nicht so groß, daß er sich bei der Erwärmung des Gefäßes auf 38° C störend bemerkbar machen würde. Wegen der relativ großen Maße der schlecht wärmeleitenden Gummistopfen ist ein etwas längerer Temperaturausgleich erforderlich. Nach dem Versuch muß man entsprechende Zeit abkühlen lassen, ehe man die Stopfen lösen kann.

Alle Metallteile des isometrischen Hebels und seines Spannrahmens bestehen aus Messing, das nach der Anfertigung des Hebels elektrolytisch vergoldet wurde. *Die Elektroden* wurden aus V2A-Stahl bzw. vergoldetem Platin hergestellt. Zur Herstellung der Hakenelektrode (*2*, Abb. 1 A) wurde V2A-Stahl verwendet. Hakenelektrode und der sie führende Messingstab sind bis zu deren gekrümmten Endstück zur Isolierung mit einem säurefesten Lack überzogen. Diese Hakenelektrode dient als Anode. Die Kathode (*4*) besteht aus einem vergoldetem Platindraht, der in einem Glasstopfen eingeschmolzen ist. Bei Verwendung von Platin für die Reizelektrode beobachtet man auch im Leerversuch ohne Reizung eine Sauerstoffaufnahme auf Grund einer durch Platin katalysierten Oxydation (McIlwain 1951 a;

Weeks und Chenoweth 1952). Der Platindraht wurde deshalb nach dem Vorgehen von McIlwain (1951 b) nach dem Einschmelzen in den Glasstopfen elektrolytisch vergoldet. Die Zuleitung für die vergoldete Platinelektrode (*4*) durch das Wasser des Thermostaten ist durch einen Gummischlauch isoliert, nicht dagegen die Zuleitung der Anode (*2*). Die elektrische Reizung erfolgte durch Impulse von 1Millisekunden Dauer und 9 –11 Volt Spannung, die von einem Glimmlampenkippgerät erzeugt wurden. Die Reizfrequenz betrug 65 pro min.

Die *Eichung des Atmungstroges* wurde nach der von Warburg (1923) angegebenen manometrischen Methode vorgenommen. Das in Abb. 2 abgebildete Gefäß hat ein Gesamtvolumen von 23,4 cm³. Der Manometerdruck kann gut auf 0,5 mm genau abgelesen werden. Die gemessenen Druckdifferenzen pro Stunde betrugen zwischen 20 und 30 mm.

Die Wirksamkeit der *CO_2-Absorption* in der mit 0,2 ml 10%iger KOH und einem Filtrierpapierstreifen beschickten Birne (*8*) am Manometerschliff wurde geprüft, indem die zeitliche Absorption des durch Einkippen von 0,5 ml 0,04 n Na_2CO_3-Lösung aus dem Seitenarm zu 3 ml 0,1 n H_2SO_4-Lösung in den Hauptraum entstehenden CO_2 gemessen wurde. Die CO_2-Absorption war kaum geringer als die bei Atmungsgefäßen mit in der Mitte stehenden Einsätzen; sie betrug ein Vielfaches der bei den Versuchen zu erwartenden CO_2-Mengen.

Es ist besonders geprüft worden, inwieweit der Stromfluß in der Suspensionslösung allein eine Änderung des Gasdruckes verursacht. Bei der in den Versuchen verwendeten Spannung von 9 11 Volt trat keine Änderung des Gasdruckes im Leerversuch auf. Erst bei Erhöhung der Spannung auf 20 28 Volt machte sich eine minimale Erhöhung des Druckes bemerkbar, vermutlich auf Grund einer elektrolytischen Dissoziation des Wassers.

Zur *Reinigung* des Glasgefäßes wurde Bichromat-Schwefelsäure, für die Hartgummistopfen und die vergoldeten Metallteile verdünnte Salzsäure verwendet.

Zur *Registrierung der isometrischen Kontraktionen* wurde das Manometer alle 10 15 min für 15—30 sec angehalten. Um den Spiegel des Hebels dabei jedesmal an die gleiche Stelle des Strahlenganges der Lichtquelle des optischen Zeigers zu bringen, sind an der die Manometer tragenden Führungsschiene sowie an der Thermostatenwandung Vorkehrungen getroffen, die es erlauben, das Manometer jeweils an der gleichen Stelle zu fixieren. Die Achse des Atmungsgefäßes wird gegenüber dem Manometer in gleicher Lage gehalten durch einen Leichtmetallstab, der von der Spannleiste des Manometers her ins Thermostatenwasser hineintaucht, und gegen den das Außenteil eines Hartgummistopfens anliegt (Abb. 2).

Die Beleuchtungsquelle für den Spiegel des isometrischen Hebels hängt über dem Thermostaten. Zur Ausschaltung der unruhigen Wasseroberfläche, durch die ein konstanter Strahlengang unmöglich wäre, taucht während der Messung eine mit einer planparallelen Glasplatte verschlossener Zylinder an der Stelle des Strahlendurchtritts in das Thermostatenwasser ein. Der am isometrischen Hebel reflektierte Lichtstrahl trifft nach dem Austritt aus dem Thermostaten auf einen weiteren Spiegel, von dem er zu dem Aufnahmespalt eines Photokymographions reflektiert wird. Eine auf diese Weise gewonnene Originalkurve ist in Abb. 3 wiedergegeben.

Präparation des Muskelstreifens: Als Versuchstiere dienten Sprague-Dawley-Ratten beiderlei Geschlechts von 190—290 g Gewicht. Nach der Dekapitation wurde das Herz der Ratte sofort herausgenommen und in eine gut mit Sauerstoff durchströmte Versuchslösung verbracht. Nachdem das weiterschlagende Herz sein Blut ausgestoßen hatte, wurde es auf ein angefeuchtetes Filtrierpapier gelegt und während der nun folgenden Präparation laufend mit O_2-gesättigter Ringer-Lösung betropft. Der re. Ventrikel wurde freipräpariert und von seiner Muskelplatte an ihrer dünnsten Stelle ein 1—2 mm breiter Streifen vom Klappenrand bis zur Spitze,

etwa 8 –12 mm lang, herausgeschnitten. Die Dicke des Streifens betrug 0,6 bis 1,0 mm, im Mittel 0,8 mm.

Der Streifen wurde jetzt an dem Haken befestigt, der durch ein Haar mit dem isometrischen Hebel (*1*, Abb. 1 B) verbunden ist, und durch den zum Hebel gehörenden seitlichen Glasschliff in das Atmungsgefäß eingeführt. Darauf wurde der den Hebel tragende Hartgummistopfen in den Glasschliff eingedreht und das Atmungsgefäß mit 2,7 ml O_2-gesättigter modifizierter (s. u.) RINGER-Lösung beschickt. Der jetzt in der Suspensionslösung schwimmende Muskelstreifen wurde nun mit einer gebogenen Pinzette von oben her durch die Öffnung des zum Manometer gehörenden Schliffes an der entsprechend weit vorgeschobenen Hakenelektrode (*2*, Abb. 1 A)

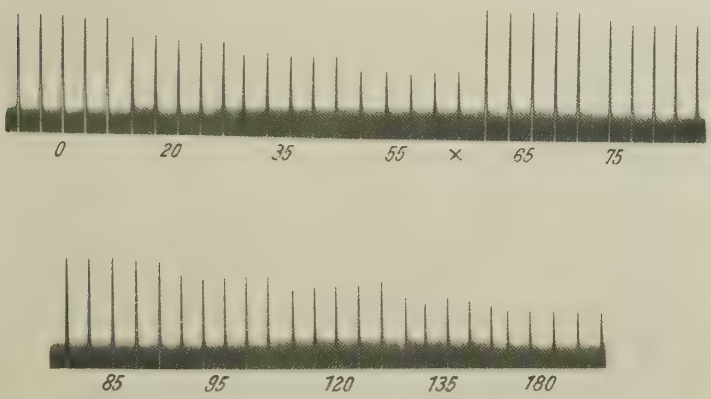


Abb. 3. Mechanogramm eines Streifens aus dem re. Ventrikel einer Ratte. Die Zahlen unter dem Mechanogramm geben die Zeit in Minuten an. Bei *x* wurde aus der Seitenbirne Strophanthin in den Hauptraum des Gefäßes gekippt.

befestigt. Die zweite Elektrode (*4*) wurde durch Drehung des sie tragenden Glasstopfens zum Anliegen an den Muskelstreifen gebracht. Darauf wurde das Atmungsgefäß am Manometer befestigt und mit der Sauerstoffdurchströmung begonnen.

Vom Augenblick der Tötung des Tieres bis zum Einbringen des Herzmuskelstreifens in das Gefäß und dem Beginn der Sauerstoffdurchströmung vergingen 8—10 min.

Nach dem fertigen Montieren und Sichern der verschiedenen Schliffe mit Gummibändern wurde das Gefäß in den Thermostaten eingebracht und mit dem Schütteln begonnen, während die Sauerstoffdurchströmung noch für 10 min weiterging. Nach einem anschließendem Temperaturausgleich von 15 min erfolgte — etwa 35 min nach Tötung des Tieres — die erste Ablesung.

Noch vor der ersten Ablesung wurde der Herzmuskelstreifen mittels des Feintriebes (*9*, Abb. 1 A) unter der Kontrolle des Lichtzeigers bis zu einer Anfangsspannung von 100—150 mg gespannt, und der die Hakenelektrode führende Messingstab durch die Stellschraube im äußeren Teil des Hartgummistopfens (*1*, Abb. 1 A) arretiert. Bei der geringen Anfangsspannung dehnte sich der Muskel, wenn überhaupt, nur anfangs sehr wenig und behielt während des ganzen Versuchs seine Länge und damit auch die Ausgangsstellung des Lichtzeigers konstant.

Von der ersten Ablesung an wurde der Muskel fortlaufend gereizt. Die Zugabe der Strophanthinlösung während des Versuchs erfolgte ohne Entfernung des

Atmungstroges aus dem Thermostatenbad, um eine Veränderung des Gasdruckes durch Abkühlung zu vermeiden. Dadurch war es möglich, ohne Zeitverlust auch nach der Strophanthinzugabe verwertbare Messungen des Sauerstoffdruckes vorzunehmen.

Die Zusammensetzung der Suspensionslösung entsprach der von Masuoka und Saunders (1950) für den Herzstreifen der Ratte angegebenen (in Mol pro Liter): NaCl 0,15; KCl 0,0056; CaCl 0,003; Glucose 0,0056; Phosphat-Puffer 0,00105. Das p_H der Lösung betrug 7,4. Es sank im Laufe eines dreistündigen Versuchs nicht unter 7,1 ab.

g-Strophanthin (Kali-Chemie A.G.) wurde in der Suspensionsflüssigkeit gelöst.

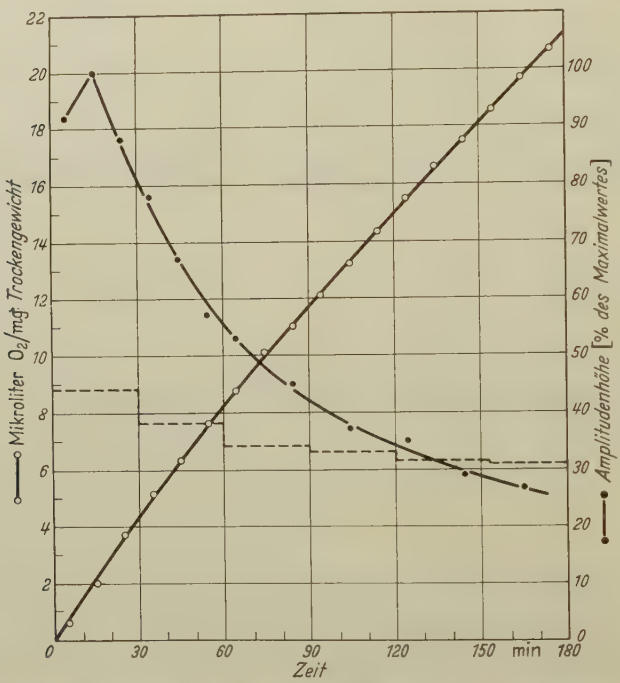


Abb. 4. „Spontane" Insuffizienz eines Herzmuskelstreifens. o——o Sauerstoffverbrauch in μl O_2/mg Trockengewicht; • ——• Amplitudenhöhe der isometrischen Kontraktionen in Prozent des Maximalwertes. Die gestrichelte Linie gibt die Atmungs-(QO_2-)Werte für die 30 min-Abschnitte wieder.

Ergebnisse.

I. „Spontane" Insuffizienz des Herzmuskelstreifens der Ratte.

Die Atmung der Herzmuskelstreifen in phosphatgepufferter Elektrolytlösung mit Glucose als Substrat verläuft nicht gleichmäßig über mehrere Stunden, sondern nimmt vom Beginn des Versuchs an ab. In Abb. 4 ist der Sauerstoffverbrauch pro Milligramm Trockengewicht im zeitlichen Verlauf kurvenmäßig dargestellt. Außerdem sind die Atmungswerte für die einzelnen 30 min-Abschnitte noch gesondert aufgetragen. Aus ihnen geht hervor, daß die Atmung während der ersten

1½ Std stärker abnimmt als in der darauffolgenden Zeit. Am Ende der dritten Stunde beträgt der Sauerstoffverbrauch in diesem Versuch noch 70% des Ausgangswertes, im Durchschnitt aller Versuche 77% (siehe Abb. 7).

Wesentlich mehr als die Atmung nimmt die Kontraktionskraft des Muskelstreifens in der gleichen Versuchszeit ab (Abb. 4). Die Spannung der isometrischen Kontraktionen beträgt nach 1 Std im Durchschnitt noch 57% und nach der 3. Std noch etwa 25% des Ausgangswertes. Auch die prozentuale Verminderung der Kontraktionskraft ist also in den ersten 1½ Std größer als in den folgenden.

Tabelle 1. *Atmungswerte der ersten und zweiten halben Stunde in Gegenüberstellung zur Abnahme der Kontraktionskraft 45 min nach Versuchsbeginn.*

QO_2 0–30	QO_2 30–60	Amplitudenhöhe in % des Ausgangswertes 45 min nach Versuchsbeginn
8,5	7,9	82
8,8	7,6	87
8,8	7,6	67
8,4	7,8	49
8,4	8,0	54
7,8	7,8	68
9,0	8,8	75
7,4	7,0	59
8,0	7,0	67
7,5	6,7	68
7,9	7,7	78
7,2	7,0	48
6,4	6,6	58
8,0 ± 0,2	7,5 ± 0,16	66 ± 3,4

In der Tab. 1 sind die Atmungswerte der 1. Std aufgeteilt in die der ersten und der zweiten 30 min-Periode. Den Atmungswerten der zweiten 30 min-Periode sind die Amplitudenhöhen der isometrischen Kontraktionen in der Mitte dieses Zeitabschnittes, also 45 min nach Versuchsbeginn, gegenübergestellt. Einer Abnahme der Spannungswerte um durchschnittlich 34% steht eine Verminderung der Atmung von 6% gegenüber.

Der Muskel verliert seine anfängliche Kontraktionskraft auch ohne ständig gereizt zu werden. Die Abb. 5 gibt einen Versuch wieder, bei dem der Muskelstreifen nach der Messung der anfänglichen Kontraktionskraft 1 Std lang nicht gereizt wurde. Auch hier hatte die Kontraktionskraft nach 1 Std um 37% abgenommen und verhielt sich bei der nun andauernden 60mal pro Minute erfolgenden Reizung genau so wie bei dem Versuch der Abb. 4.

Aus dem in Abb. 5 wiedergegebenen Versuch geht ferner hervor, daß die Abnahme des Sauerstoffverbrauchs in der zweiten halben Stunde unabhängig von der Reizung und den isometrischen Kontraktionen erfolgt, und weiter, daß durch die Reizung der O_2-Verbrauch gegenüber dem Vorstadium nicht vermehrt wird. Dies ist noch in weiteren Versuchen bestätigt worden, die darauf abgestellt waren, einen Unterschied im Sauerstoffverbrauch zwischen der 30 min dauernden „Ruhe"- und der 30 min dauernden „Reiz"-Periode festzustellen. Auch bei diesen Versuchen lag der QO_2-Wert der zweiten 30 min-Periode regelmäßig tiefer als der der ersten. Da die Abnahme des Sauerstoffverbrauchs in der zweiten halben Stunde durchschnittlich 6% betrug (Tab. 1), muß eine durch die isometrischen Kontraktionen auftretende Atmungssteigerung geringer sein als 3% der Gesamtatmung. Offenbar reicht für die minimale Spannungsarbeit, die in der Versuchsanordnung von dem Muskelstreifen verlangt wird, der „Ruhe"-Stoffwechsel aus.

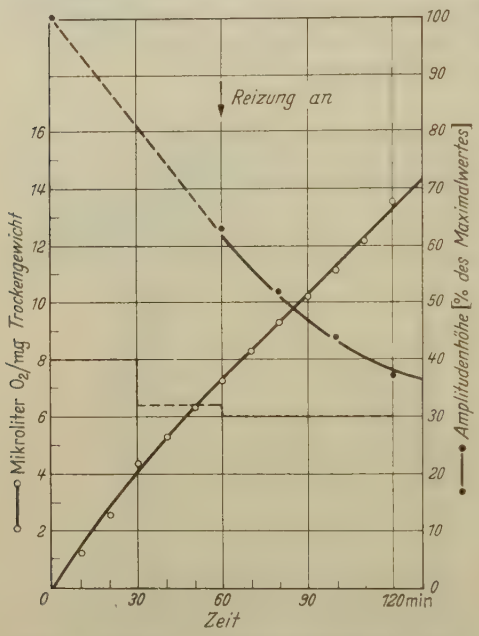


Abb. 5. „Ermüdung" des Herzmuskelstreifens ohne Reizung und isometrische Kontraktionen. Zwischen der 1. und 60. min wurde der Muskel nicht gereizt.

Der Ruhestoffwechsel des Warmblüterherzens ist wesentlich größer als der der Skeletmuskulatur. Weeks und Chenoweth (1952) fanden für den ruhenden Zwerchfellmuskel von Ratten des gleichen Stammes, wie sie in diesen Untersuchungen verwandt wurden, einen Atmungswert von 4,2, also etwa 50% des QO_2-Wertes des „ruhenden" Herzmuskelgewebes des gleichen Tieres. Bei isometrischen Kontraktionen mit einer Frequenz von 200/min erhöhte sich der QO_2 des Rattenzwerchfells von 4,2 auf 6,9. Der um 100% höhere Ruhestoffwechsel des Herzmuskels entspricht dem Umstand, daß das Herz eine Aktionslosigkeit nicht kennt und bei seinen rhythmischen Kontraktionen auch ohne besondere Belastung eine geringe Arbeit zu leisten hat.

Während das Rattenherz in vivo 350—400mal in der Minute schlägt, kann der Herzstreifen in der hier verwendeten Elektrolytlösung nur 60—100mal in der Minute gereizt werden, ohne zu rasch zu ermüden. Dieser Umstand und die relativ rasche Abnahme der Kontraktionskraft (in 1 Std um 43%) dürften auf die unphysiologischen Bedingungen der phosphatgepufferten Ringer-Lösung zurückzuführen sein. Besonders

ungünstig wirkt sich auf die Kontraktionskraft ein höherer Phosphatgehalt der Suspensionslösung aus. Masuoka u. Saunders (1950) haben die Einwirkung von Phosphat auf die Kontraktionskraft von Rattenherzmuskelstreifen studiert und gefunden, daß schon ein Fünftel der Phosphatkonzentration, die in der für Stoffwechseluntersuchungen häufig verwendeten Lösung von Krebs u. Henseleit (1932) enthalten ist, zu einer außerordentlich raschen „Ermüdung" des Rattenherzstreifens führt. Die bei unseren Versuchen verwendete Phosphatkonzentration beträgt ein Zehntel derjenigen der Lösung von Krebs u. Henseleit.

Als Ursache für die beobachtete Abnahme der Kontraktionskraft und der Atmung der Herzmuskelstreifen muß also eine Schädigung des Gewebes durch eine nicht physiologische Suspensionslösung angesehen werden. Durch diese Schädigung leidet die Kontraktionskraft des Muskels in stärkerem Maße als die Atmung.

II. Wirkung von Strophanthin auf Kontraktionskraft und Sauerstoffverbrauch des hypodynamen Herzmuskelstreifens der Ratte.

Wird dem Muskelstreifen 1 Std nach Beginn des Versuches, wenn die Abnahme seiner Kontraktionskraft nicht mehr als die Hälfte betragen hat, Strophanthin in der endlichen Konzentration von $3{,}3 \times 10^{-5}$M, die in Vorversuchen in Übereinstimmung mit Masuoka u. Saunders (1950) sich hinsichtlich der inotropen Wirkung als optimal erwiesen hatte, zugegeben, so nimmt die Spannung der isometrischen Kontraktion rasch zu und erreicht innerhalb von 5 min ihr neues Maximum (Abb. 3 und 6). Dieses liegt in der Höhe des Ausgangswertes, bei einigen Versuchen auch deutlich darüber. Die Kontraktionskraft nimmt dann nach einiger Zeit wieder ab, bis sie etwa 2 Std später wieder den Wert vor der Strophanthinzugabe erreicht hat.

Während bei den Kontrollversuchen der Sauerstoffverbrauch auch nach der ersten Versuchsstunde weiterhin abnimmt (Abb. 4 und 7), wird nach der Zugabe von Strophanthin die weitere Verminderung des oxydativen Stoffwechsels fast vollständig aufgehoben. Die Abb. 7 gibt eine Zusammenstellung der Atmungswerte aller Kontrollversuche und der Versuche, bei denen nach 1 Std Strophanthin zugesetzt wurde. Während der QO_2 bei den Kontrollversuchen von 8,0 in der ersten halben Stunde auf 6,1 am Ende der 3. Std abnimmt, beträgt der QO_2-Wert der Strophanthinversuche am Ende der 3. Versuchsstunde noch 7,03. Diese Unterschiede sind signifikant.

Der Sauerstoffverbrauch nimmt während der inotropen Strophanthinwirkung gegenüber dem Zeitabschnitt der muskulären Insuffizienz nicht zu (Abb. 7). Die Wiederherstellung der ursprünglichen Kontraktionskraft erfolgt demnach durch eine Verbesserung des Wirkungsgrades.

Strophanthin verursacht in der inotrop wirksamen Konzentration bei isometrischen Bedingungen also weder eine Steigerung noch eine Verminderung des oxydativen Stoffwechsels, wenn der Muskel sich in einem Zustand befindet, in dem er auf die inotrope Strophanthinwirkung noch voll anspricht. Es wirkt der normalerweise in dieser Versuchsanordnung auftretenden Verminderung des oxydativen Stoffwechsels

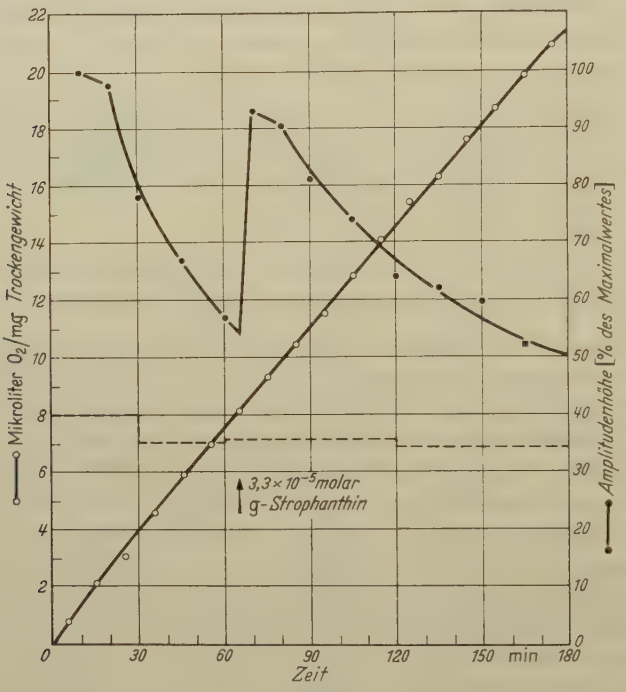


Abb. 6. Wirkung von Strophanthin auf Kontraktionskraft und Sauerstoffverbrauch des Herzstreifens der Ratte. 60 min nach Versuchsbeginn wurde der Suspensionslösung des Muskels Strophanthin zugegeben. o——o Sauerstoffverbrauch in μl O_2/mg Trockengewicht. •——• Amplitudenhöhe der isometrischen Kontraktionen in Prozent des Ausgangswertes.

entgegen und hebt sie beinahe auf, was als *stabilisierende Wirkung* auf den Stoffwechsel bezeichnet werden kann.

Anders liegen die Verhältnisse, wenn Strophanthin in der inotrop wirksamen Konzentration erst nach der maximalen Abnahme des Sauerstoffverbrauchs zugesetzt wird. Dann kann es eine Steigerung der Atmung bewirken. Bei dem in Abb. 8 wiedergegebenen Versuch wurde Strophanthin nicht nach 60 min, sondern nach 125 min zugegeben, als die Kontraktionskraft auf etwa 30% und der Atmungswert auf 6,3 abgesunken war. Nach Strophanthinzusatz ist die Verbesserung der

isometrischen Kontraktionen gering und übersteigt nicht 50% des Ausgangswertes. Die Atmung aber nimmt deutlich zu (QO_2 7,4). Dieser atmungsstimulierende Effekt ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Untersuchungen an nicht gereizten Herzmuskelschnitten (Lévi, Libert u. Schwob 1946; Wollenberger 1947a; Finkelstein u. Bodansky 1948), bei denen das Herzglykosid erst zugegeben wurde, nachdem der anfängliche Abfall des Sauerstoffverbrauchs vorüber und eine gleichmäßige Atmungsgeschwindigkeit erreicht war.

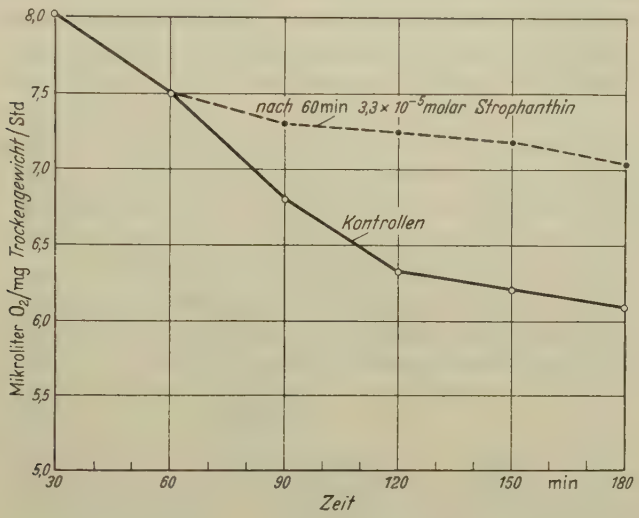


Abb. 7. Wirkung von Strophanthin in der inotrop optimalen Konzentration auf den Sauerstoffverbrauch von Herzmuskelschnitten der Ratte. o——o Mittel der QO_2-Werte für die 30 min-Abschnitte der nicht behandelten Streifen; •-----• Mittel der QO_2-Werte der Herzstreifen, denen 60 min nach Versuchsbeginn Strophanthin zugegeben wurde.

Wollenberger (1947a) gibt an, daß die Abnahme des Sauerstoffverbrauchs seiner Meerschweinchenherzschnitte 33% betrug, bevor er ihnen Strophanthin zusetzte. Dieser Wert liegt etwas höher als die maximale Abnahme des Sauerstoffverbrauchs, die in den Versuchen am Rattenherzstreifen beobachtet wurde. Das gleichzeitig mit der Atmung registrierte Mechanogramm (Abb. 8) zeigt nun, daß zu diesem Zeitpunkt, nämlich nach der maximalen Abnahme des O_2-Verbrauchs, die kontraktilen Elemente des Muskels irreparabel geschädigt sind. Dies ist verständlich, wenn man die starken Veränderungen berücksichtigt, die Fischer, Huber u. Langemann (1951) bei Herzmuskelschnitten des Meerschweinchens nach längerer Inkubation in Ringerlösung histologisch nachweisen konnten. Auch am ganzen isolierten Herzen tritt bei langdauernden Versuchen ein Stadium ein, in dem der Herzmuskel

gegenüber der inotropen Strophanthinwirkung in zunehmendem Maß refraktär wird (Gremels 1937). Das Ausmaß der Schädigung des Muskels und ihr zeitlicher Eintritt ist von Präparation zu Präparation verschieden. In einigen Versuchen betrug die Kontraktionskraft 180 min nach Versuchsbeginn und 100 min nach Strophanthinzusatz noch 70% des Ausgangswertes mit nur geringer Abnahme der Atmung.

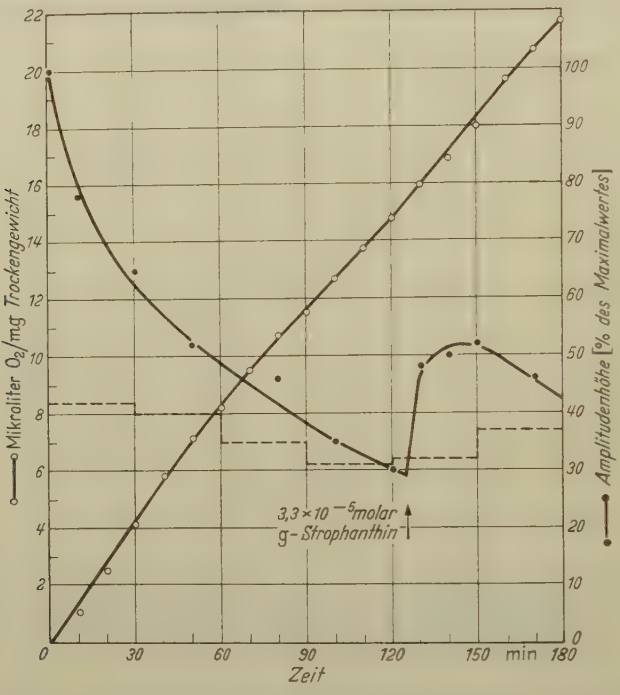


Abb. 8. Wirkung von Strophanthin auf Atmung und Kontraktionskraft nach maximaler Abnahme des Sauerstoffverbrauchs 125 min nach Versuchsbeginn.

Die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs, die Finkelstein und Bodansky (1948) nach Zugabe des Glykosids Scillirosid zu Beginn von Versuchen mit Herzmuskelschnitten der Katze beobachteten, beschränkte sich auf eine Konzentration, welche die inotrop wirksame 100fach übersteigt. Auch am Papillarmuskel der Katze fanden sie mit der inotrop wirksamen Konzentration keine Steigerung des O_2-Verbrauchs, wohl aber mit der 100mal stärkeren.

Diskussion.

Aus den mitgeteilten Versuchen geht hervor, daß Strophanthin in einer inotrop optimal wirksamen Konzentration den O_2-Verbrauch von Herzmuskelstreifen nicht vermehrt. Vielmehr wird die Abnahme des

Stoffwechsels, welche die Herzmuskelstreifen und -schnitte in Elektrolytlösungen erleiden, durch die inotrop wirksamen Stroph.-Konzentr. weitgehend verhindert. Die in der Literatur berichteten Stoffwechselsteigerungen sind entweder zurückzuführen auf Strophanthinkonzentrationen, die die therapeutische um ein Vielfaches übersteigen, oder aber auf das Vorliegen eines irreparabel geschädigten Gewebes[1].

Man wird wohl annehmen dürfen, daß die *stabilisierende Wirkung* von Strophanthin auf den Stoffwechsel des isolierten Herzmuskelgewebes mit der inotropen Muskelwirkung in engem Zusammenhang steht, wie auch anzunehmen ist, daß die Verminderung der Atmung und die Abnahme der Kontraktionskraft auf die gleiche Ursache zurückzuführen sind. Der Muskelkontraktion liegt die Reaktion eines Systems zugrunde, das aus Actomyosin, A.T.P. und Ionen besteht (H. H. Weber u. H. Portzehl 1952). Eine Veränderung der optimalen Konzentration einer dieser Reaktionspartner wird die Kontraktionsfähigkeit beeinträchtigen. Der Gehalt an *Actomyosin* wird sich im Verlauf des Versuchs nur langsam ändern. Aus der Tatsache der völligen Wiederherstellung der Kontraktionskraft 1 Std nach Versuchsbeginn (Abb. 3 und 6) kann geschlossen werden, daß zu diesem Zeitpunkt noch keine wesentliche Verminderung an kontraktionsfähigem Eiweiß besteht. Jedoch muß im späteren Verlauf des Versuchs mit einem Abbau oder einer zur Funktionsminderung führenden Veränderung der kontraktilen

[1] *Anmerkung bei der Korrektur:*

Von dem Herausgeber, Herrn Professor Lendle, werde ich freundlicherweise auf den scheinbaren Widerspruch hingewiesen, in dem diese Ergebnisse zu Befunden von Rothlin und Schoelly (1950) stehen. Diese Autoren hatten, wie auch Lévy, Libert und Schwob (1946), Ratten in vivo therapeutische Dosen von Digitalis bzw. Strophanthin gespritzt, die Tiere nach einer bestimmten Zeit getötet und die Atmung ihrer geschnittenen Herzmuskulatur gemessen. Die Herzmuskelschnitte der so vorbehandelten Tiere hatten im Durchschnitt einen höheren Atmungs-(QO_2-)Wert als die der nicht vorbehandelten Vergleichstiere. Daraus folgerten Rothlin und Schoelly, wie auch Lévy et al., die herzwirksamen Glykoside verursachen in therapeutischen Dosen in vivo eine Stoffwechselsteigerung des Herzmuskels. Auf Grund der von mir mitgeteilten Versuche können diese Befunde von Rothlin und Schoelly, bzw. Lévy et al. anders interpretiert werden. Wenn die Suspension von Herzmuskelschnitten in sauerstoffgesättigter Elektrolytlösung den Stoffwechsel des Gewebes schädigt, so gilt das gleiche natürlich auch für die Zeit der Präparation der Schnitte. Es ist also anzunehmen, daß die Gewebsschnitte zum Zeitpunkt des Beginns der Atmungsmessung sich nicht mehr in dem gleichen idealen Zustand befinden wie in vivo. Der Atmungswert der schon in vivo mit Digitalis oder Strophanthin behandelten Herzmuskelschnitte ist der eines Gewebes, das durch die *stabilisierende* Wirkung der Herzglykoside vor der Schädigung durch Elektrolytlösung und Präparation weitgehend geschützt wird, d. h. es lassen sich auch die Ergebnisse der angeführten „in vivo"-Versuche durch die in Abb. 7 dargestellte Beziehung erklären ohne Annahme einer in vivo erfolgenden Stoffwechselsteigerung des Herzmuskels.

Substanz gerechnet werden (Abb. 8). Änderungen der *Adenosintriphosphat*-Konzentration können nur auftreten, wenn entweder der oxydative Stoffwechsel vermindert oder die Bildung von energiereichem Phosphat isoliert gehemmt wird. Eine wesentliche Verminderung von energiereichem Phosphat am Ende der ersten Versuchsstunde ist wenig wahrscheinlich, da hier die Abnahme der Atmung durchschnittlich nur 6% beträgt (Tab. 1). Wenn eine durch diese relativ geringe Atmungsverminderung eintretende Abnahme der A.T.P.-Konzentration für das Zustandekommen der Hypodynamie entscheidend wäre, so könnte der Muskel unter Strophanthin nicht bei der gleichen Stoffwechselhöhe wieder die alte Kontraktionskraft erlangen. Über den Gehalt des insuffizienten Herzens an energiereichem Phosphat liegen Untersuchungen vor von Wollenberger (1947b) sowie von Greiner (1952). Wollenberger fand bei insuffizienten Hundeherzen den Gehalt an energiereichem Phosphat gegenüber der Norm nicht vermindert. Greiner untersuchte isolierte Papillarmuskeln der Katze auf ihren A.T.P.-Gehalt. Diese Papillarmuskeln kontrahierten sich isometrisch unter ähnlichen Bedingungen, wie sie für unsere Versuche galten. Bei einer Abnahme der Kontraktionskraft um 50% war der Gehalt an Adenosintriphosphat gegenüber der Norm nicht vermindert. Demnach muß man annehmen, daß die Rattenherzstreifen, deren Kontraktionskraft zum Zeitpunkt der Strophanthinzugabe auf durchschnittlich 56% zurückgegangen war, noch über eine ausreichende Menge A.T.P. verfügten.

Holland, Dunn u. Greig (1952) beobachteten, daß der Kaliumgehalt isoliert schlagender Meerschweinchenvorhöfe nach Inkubation in Tyrodelösung rasch abnimmt, und Bammer u. Rothschuh (1952) fanden, daß auch in Ringer-Lösung suspendierte, ruhende Froschherzstreifen Kalium abgeben. Der gleiche Befund ist für Hirnrindenschnitte von Terner, Eggleston u. Krebs (1950) sowie für Leberschnitte von Aebi (1952) erhoben worden. Es muß daher angenommen werden, daß auch die in einer Elektrolytlösung suspendierten Herzmuskelstreifen der Ratte während des Versuches einen beträchtlichen Teil ihres intracellulären Kaliumgehalt verlieren. Kalium ist für den Fundamentalvorgang der Kontraktion des Actomyosinsystems zwar nicht unerläßlich und kann durch Natrium in geeigneter Konzentration ersetzt werden (H. H. Weber u. H. Portzehl, 1952), doch ist die Kaliumverarmung nur *ein* Zeichen der Störung des *intracellulären Ionenmilieus*, dessen optimale Ionenstärke und dessen optimales p_H mit großer Wahrscheinlichkeit bei der Störung der Ionenverteilung verändert werden. Solche Veränderungen im Milieu wirken sich nicht nur nachteilig auf den Kontraktionsvorgang des Actomyosins, sondern auch auf die Geschwindigkeit des cellulären Stoffwechsels aus. Darüber hinaus führt die Verminderung des intracellulären Kaliumgehaltes zu Störungen des

Erregungsvorganges an der Membran und deren Überleitung auf die Muskelfibrillen, wofür Kalium-Ionen unersetzbar zu sein scheinen. So haben elektrophysiologische Untersuchungen gezeigt, daß die Leitungsgeschwindigkeit der Erregungswelle bei Auftreten der Insuffizienz des isolierten Herzens sinkt (Brendel, Gladewitz, Hildebrandt und Trautwein, 1951). Bei den hier beschriebenen Versuchen mit Herzmuskelstreifen der Ratte fiel auf, daß im Stadium der Hypodynamie die Reizschwelle der Muskelstreifen um einige Zehntelvolt erhöht war und nach Strophanthinzugabe wieder abnahm.

Kaliumverlust, der über die bei jeder Muskelkontraktion erfolgende Kaliumabgabe hinausgeht, deutet bei ausreichender Energieversorgung auf eine Schädigung der Zellmembran, die nicht mehr in der Lage ist, durch selektive Auswahl die Zusammensetzung des intracellulären Ionenmilieus zu regulieren. Für den Mechanismus der Strophanthinwirkung ist daraus zu folgern, daß durch seine Einwirkung die Zellmembran in ihrer Durchlässigkeit gegenüber Ionen beeinflußt wird.

Die Auffassung von einer auf die Zellmembran gerichteten Wirkung des Strophanthins wird unterstützt durch die negativen Ergebnisse der Versuche, die Strophanthinwirkung durch eine direkte Beeinflussung der energieliefernden Fermentsysteme des Kohlenhydratstoffwechsels zu erklären oder durch Beeinflussung der Myosin-A.T.Pase (Reiter u. Barron 1952). Gleichfalls negativ verliefen die Versuche, die Kontraktion von glycerinextrahierten Muskelfasern (Korey 1950) sowie die Superpräzipitation des aus Herzmuskel isolierten Actomyosins (Hajdu u. Szent Györgyi 1952; Kuschinsky, Lange u. Turba 1952) durch herzwirksame Substanzen zu beeinflussen.

Die Verminderung des oxydativen Stoffwechsels während des Versuches hält etwa 2 Std an (Abb. 7). Von dieser Zeit ab verläuft die Atmung relativ stetig. Die maximale Abnahme des Sauerstoffverbrauchs beträgt im Durchschschnitt der Versuche 23%. Ausmaß und Geschwindigkeit der Abnahme stimmen überein mit den Ergebnissen von Pearson, Hastings u. Bunting (1949), die den Stoffwechsel von Herzmuskelschnitten der Ratte untersuchten. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den von Wollenberger (1947a) am Meerschweinchen und den von Finkelstein u. Bodansky (1948) an der Katze gewonnenen, so fällt auf, daß der Atmungsabfall bei diesen Tierarten wesentlich rascher einsetzt und ein größeres Ausmaß einnimmt. Die Atmungsabnahme der Meerschweinchenherzschnitte von Wollenberger betrug im Durchschnitt 33% und war nach der ersten halben Versuchsstunde beendet, und ähnliches gilt für die Herzmuskelschnitte der Katze (Abb. 3 von Finkelstein u. Bodansky 1948). Wenn für dieses unterschiedliche Verhalten von Herzmuskelgewebe der Ratte auf der einen Seite und der Katze und des Meerschweinchens auf der anderen Seite nicht unter-

schiedliche Versuchsbedingungen verantwortlich zu machen sind, so weist dieser Befund auf eine verschiedene Resistenz der Zellmembranen der betreffenden Gewebsarten gegenüber dem schädigenden Einfluß der Ringerlösung hin. Es ist möglich, daß diese Verschiedenheit in der Eigenschaft der Zellmembranen eine wesentliche Ursache für die verschiedene Empfindlichkeit der Herzen von Katzen, Meerschweinchen und Ratten gegenüber Strophanthin darstellt.

Nimmt man an, daß Strophanthin und die übrigen herzwirksamen Glykoside die Durchlässigkeit und damit die Regulationsfähigkeit der Zellmembranen beeinflussen, dann ist zu erwarten, daß ihre Wirkung nicht auf das Herz beschränkt bleibt. Tatsächlich sind extracardiale Glykosidwirkungen in vivo auch mehrfach beschrieben worden (siehe Lendle und Oldenburg 1952). Wollenberger beobachtete (1947a) mit bestimmten Konzentrationen eine stoffwechselstimulierende Strophanthinwirkung an Schnitten der Hirnrinde und Frey (1952) eine solche an Schnitten der Nierenrinde, während Lübken (1952) durch Strophanthin eine Steigerung der Glykogensynthese in Leberschnitten erzielte. Dieser Befund von Lübken ist in Hinblick auf die oben dargelegte Auffassung über den Wirkungsmechanismus von Strophanthin besonders eindrucksvoll, da durch die Untersuchungen von Buchanan, Hastings u. Nesbett (1949) die Abhängigkeit der Glykogensynthese in Leberschnitten von der Zusammensetzung des intracellulären Ionenmilieus erwiesen ist.

Man ist versucht, die hier gewonnenen Ergebnisse auch denen der Untersuchungen am ganzen Herzen gegenüberzustellen. Die meisten Untersucher (Gremels 1933; Gollwitzer-Meier u. Krüger 1937a; Kiese u. Garan 1938) beobachteten eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs des Herzens in der Zeit der spontanen Insuffizienz und eine Verminderung des Stoffwechsels nach einer therapeutischen Dosis Herzglykosid. Wie Starling u. Visscher (1927) gefunden haben, steht der Sauerstoffverbrauch des Herzens in Beziehung zu der initialen Länge der Muskelfasern, also dem diastolischen Volumen des Herzens. Diese Ergebnisse sind von Gollwitzer-Meier u. Krüger (1937b) sowie von Kiese u. Garan (1938) im wesentlichen bestätigt worden. Auf Grund dieser Gesetzmäßigkeit kann einerseits die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs in der Insuffizienz auf das der Insuffizienz eigene größere diastolische Volumen und andrerseits die Abnahme des O_2-Verbrauchs nach der therapeutischen Glykosidgabe auf die mit der inotropen Glykosidwirkung verbundenen Verkleinerung des diastolischen Volumens zurückgeführt werden. Deshalb stellen Gollwitzer-Meier u. Krüger (1937a) auf Grund ihrer Versuche fest: „Die Abnahme des Sauerstoffverbrauchs (nach Glykosid) erfolgt proportional derjenigen des diastolischen Volumens." Inwieweit nun aber neben einer Änderung des O_2-Verbrauchs auf Grund dieser Gesetzmäßigkeit eine davon unabhängige und für die Insuffizienz oder die Glykosidwirkung spezifische Änderung des Stoffwechsels stattfindet, kann nur dann entschieden werden, wenn eine Veränderung des Sauerstoffverbrauchs durch Veränderung der

initialen Faserlänge auch im Stadium der Insuffizienz ausgeschaltet wird. Dies geschieht in der Anordnung von Peters u. Visscher (1936), die es erlaubt, das diastolische Volumen des Herzens konstant zu halten. Peters u. Visscher beobachteten mit dieser Versuchsanordnung bei einer größeren Zahl ihrer Versuche in der spontanen Insuffizienz neben der Verminderung des Wirkungsgrades auch eine mehr oder weniger starke Abnahme des Sauerstoffverbrauchs, die durch therapeutische Glykosidgabe wieder rückgängig gemacht wurde. Es ist daraus ersichtlich, daß weitreichende Übereinstimmungen bestehen zwischen den Ergebnissen, die am ganzen Herzen mit konstant gehaltenem diastolischen Volumen und denen, die am Herzstreifen der Ratte bei isometrischen Kontraktionen gewonnen worden sind.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine Versuchsanordnung beschrieben, mit der Kontraktionskraft und Sauerstoffverbrauch von isolierten Herzmuskelstreifen des Warmblüters gleichzeitig gemessen werden können.

2. Sauerstoffverbrauch und Kontraktionskraft des in modifizierter Ringerlösung suspendierten Herzstreifens der Ratte nimmt mit zunehmender Inkubationszeit ab, die Kontraktionskraft in prozentual größerem Ausmaß als der Sauerstoffverbrauch.

3. Als Ursache für diese Veränderungen wird eine durch die Suspensionslösung erfolgende Schädigung der Zellmembranen angesehen, die nicht mehr in der Lage sind, durch selektive Auswahl die normale Zusammensetzung des intracellulären Ionenmilieus aufrechtzuerhalten.

4. Strophanthin verhindert in einer Konzentration, in der es die Kontraktionskraft des hypodynamen Muskelstreifens wieder herstellt, die in den Kontrollversuchen eintretende Verminderung des oxydativen Stoffwechsels. Es wird der mögliche Mechanismus der Strophanthinwirkung diskutiert.

5. Nach längerer Inkubationszeit, wenn eine maximale Abnahme des Sauerstoffverbrauchs erreicht ist und die Kontraktionskraft auf etwa 30% abgenommen hat, tritt nach Strophanthingabe eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs auf. Die inotrope Wirkung auf die Kontraktionskraft ist dabei nur gering, was als Zeichen einer im späteren Versuchsstadium auftretenden irreparablen Schädigung der kontraktilen Substanz gewertet wird.

6. Die Gegenüberstellung der am Herzmuskelgewebe von Ratten gewonnenen Ergebnisse mit den von anderen Autoren an Herzmuskelschnitten von Meerschweinchen und Katzen gewonnenen zeigt, daß diese

Gewebsarten gegenüber dem schädigenden Einfluß der Suspensionslösung verschieden resistent sind entsprechend ihrer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber herzwirksamen Glykosiden.

Frl. Dr. H. Neumüller danke ich für ihre Unterstützung bei vorbereitenden Untersuchungen und Frau J. Noé für ihre Mithilfe bei der Durchführung der beschriebenen Versuche.

Literatur.

Aebi, H.: Helvet. physiol. pharmacol. acta **10**, 184 (1952). — Bammer, H. u. K. E. Rothschuh: Z. ges. exper. Med. **119**, 402 (1952). — Brendel,, W., H. Gladewitz, F. Hildebrandt u. W. Trautwein: Cardiologia **18**, 345 (1951). — Buchanan, J. M., A. B. Hastings u. F. B. Nesbett: J. of Biol. Chem. **180**, 435, 447 (1949). — Cattell, Mc K., u. H. Gold: J. of Pharmacol. **62**, 116 (1938). — Finkelstein, M., u. O. Bodansky: J. of Pharmacol. **94**, 274 (1948). — Fischer, H., P. Huber u. H. Langemann: Helvet. physiol. pharmacol. acta **9**, 416 (1951). — Frey, J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 473 (1952). — Gollwitzer-Meier, Kl., u. E. Krüger: Pflügers Arch. **238**, 251 (1937 a); **238**, 279 (1937 b). — Greiner, Th.: J. of Pharmacol. **105**, 178 (1952). — Gremels, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol.**186**, 625 (1937); **169**, 689 (1933). — Hajdu, S., u. A. Szent-Györgyi: Amer. J. Physiol. **168**, 159 (1952). — Holland, W. C., C. E. Dunn u. M. E. Greig: Amer. J. Physiol. **168**, 546 (1952). — Kiese, M., u. R. S. Garan: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **188**, 226 (1938). — Korey, S.: Biochim. biophysica acta, N. Y. **4**, 58 (1950). — Krebs, H. A., u. K. Henseleit: Hoppe-Seylers Z. **210**, 33 (1932). — Kuschinsky, G., G. Lange u. F. Turba: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 259 (1952). — Lendle, L., u. D. Oldenburg: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 243 (1950). — Lévy, J., O. Libert u. A. Schwob: Bull. Soc. Chim. biol. Paris **28**, 647 (1946). — Lübken, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 253 (1952). — Masuoka, O. T., u. P. R. Saunders: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **74**, 879 (1950). — McIlwain, H.: Biochemic. J. **49**, 382 (1951 a); **50**, 132 (1951 b). — Pearson, G. H., A. B. Hastings u. H. Bunting: Amer. J. Physiol. **158**, 251 (1949). — Peters, H. C., u. M. B. Visscher: Amer. Heart J. **11**, 273 (1936). — Reiter, M., u. E. S. G. Barron: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 341 (1952). — Rothlin, E., u. G. Schoelly: Helvet. physiol. pharmacol. acta **8**, C69 (1950). — Starling, E. H., u. M. B. Visscher: J. of Physiol. **62**, 243 (1927). — Terner, C., L. V. Eggleston u. H. A. Krebs: Biochemic J. **47**, 139 (1950). — Warburg, O.: Biochem. Z. **142**, 317 (1923). — Weber, H. H. u. Portzehl, H.: Erg. Physiol. **47**, 369 (1952). — Weeks, J. R., u. M. B. Chenoweth: J. of Pharmacol. **104**, 187 (1952). — Wollenberger, A.: J. of Pharmacol. **91**, 39 (1947 a). — Amer. J. Physiol. **150**, 733 (1947 b).

Dr. Melchior Reiter, Pharmakol. Institut d. Univ., München 15, Nußbaumstr. 28.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 333—337 (1953).

Pharmakologisches Institut der Medizinischen Fakultät Sarajewo.

Das Cardio-Pulmonal-Präparat der Ratte*.

Von

S. Begović und P. Stern.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Februar 1953.)

Wie bekannt, hat das Cardio-pulmonal-präparat (Cpp) bei pharmakologischen Untersuchungen gegenüber dem isolierten Herzen der Säugetiere den Vorzug wegen der normalen Bedingungen, unter denen das Herz arbeitet, wenn es sich mit arterialisiertem Blut aus den Lungen versorgt. Ferner bestehen Möglichkeiten einer besseren Kontrolle der Temperatur des Herzens, des Blutzu- und -ablaufes vom und zum Herzen, der willkürlichen Erhöhung und Herabsetzung des Druckes im äußeren künstlichen Blutkreislauf. Außerdem läßt sich das Cpp für die Durchspülung anderer isolierter Organe verwenden, indem man den Druck und die Temperatur des perfundierten Organs nach Gutdünken herstellt, was für das Studium des Stoffwechsels einzelner isolierter Organe ausgenutzt wird[10].

Die ersten Beschreibungen des Cpp-Präparates wurden von H. N. Martin in den Jahren 1881 und 1883[2], ferner von Jerusalem und Starling 1910[3], sowie Knowlton und Starling 1912[4] veröffentlicht. Die angeführten Autoren haben Methoden und Ausarbeitung des Cpp bei Hunden und Katzen beschrieben, J. Bock 1898[5] das gleiche bei Kaninchen nach Martins, W. Heubner 1913[8], sowie Staub und K. Bucher 1941[9] nach Starlings Methode. Also wurden nach den bisherigen Literaturnachweisen für die Ausarbeitung eines Cpp nur Hunde, Katzen und Kaninchen verwandt. Nach Angabe H. Staubs und K. Buchers[9] bekommt man am Cpp verschiedener Arten von Säugetieren unterschiedliche pharmakologische Reaktionen und zwar nicht nur quantitativ sondern auch qualitativ, was die Notwendigkeit bedeutet, daß man ein Mittel bei mehreren Säugetierarten erproben muß, um ein möglichst vollkommenes Bild der pharmakologischen Wirksamkeit des betreffenden Mittels zu erhalten.

Wegen der angeführten Tatsachen und der immer größer werdenden Verwendung von Ratten in der experimentellen Medizin sowie deren billigen Anschaffung haben wir versucht, Cpp von Ratten herzustellen. Theoretisch ist es möglich ein Cpp von jedem Säugetier herzustellen, jedoch ist die Herstellung häufig technisch undurchführbar. Cpp verlangt schnelles Arbeiten, und je kleiner das Tier ist, um so schwerer läßt es sich präparieren.

Wir haben uns zur Herstellung von Cpp von Ratten entschlossen, weil wir die angeführten Schwierigkeiten: Blutung, beschleunigtes Arbeiten usw. durch die spezielle Methode einer „Narkose" nach Ivan Giaja beseitigt haben.

* Herrn Prof. Dr. O. Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

Giaja[6] hat gezeigt, daß sich Warmblüter, wenn man sie in einen verschlossenen Raum bei gradweiser Verminderung der Sauerstoffspannung bringt, abkühlen und zwar im direkten Verhältnis zum Abfallen des Barometerdrucks und zur Temperatur der Umgebung. Sinkt die Temperatur tief genug, so gerät das Tier in einen lethargischen Zustand, der einer Narkose gleichkommt. Das Tier ist völlig anästhetisch und verharrt regungslos. Die Atmung ist stark verlangsamt, auch die Arbeit des Herzens; der Blutdruck sinkt stark und damit auch die Gefahr eines Verblutens am Orte des Operationsschnittes. Wesentlich ist beim eigentlichen Verlauf der Durchführung dieser „Narkose" nur, daß die Abnahme des O_2 mit der Abkühlung der Tiere parallel verläuft, damit das Tier nicht einer Asphyxie anheimfällt.

Die Methode der „Narkotisierung".

Wir können Ratten derart abkühlen, daß ihre Temperatur bis auf 15° im Rectum sinkt, indem wir sie in Glasbehältern von 1,5—2 l in Eiswasser stellen. Sobald wir sehen, daß ein Tier anfängt zu ersticken, öffnen wir während des Versuchs das Gefäß und führen auf diese Weise wieder Sauerstoff zu. Nach $1\frac{1}{2}$—2 Std ist die Ratte „narkotisiert", ihr Sauerstoffverbrauch sinkt bis auf 5%. Nach Giaja[7] können wir sie ohne Gefahr 24 Std in diesem Zustand lassen. (Giaja und seine Mitarbeiter[7, 1] haben in dieser Art von Narkose verschiedene Operationen wie z. B. Hypophysektomie, Thyreoidektomie usw. mit besserem Erfolg ausgeführt als sonst mit echter Narkose.) Eine derartig narkotisierte Ratte ist das ideale Objekt für die Ausführung von Cpp. In erster Linie kommt gar kein Narkoticum zur Anwendung, und somit gibt es keine Schädigung des Myocards. Das Tier ist völlig unbeweglich, anästhetisch und blutet, praktisch gesehen, bei der Operation gar nicht. Die Öffnung des Brustkorbes geschieht ohne Gefahr. Durch die Trachea kann man etwas Luft in die Lunge einblasen, die Trachea wieder schließen und ruhig weiter arbeiten.

(Die Operationen können ungefährdet, solange wir wollen, andauern, ohne daß die Ratte aufwacht, sofern die Ratte auf einer Unterlage zu liegen kommt, die sie abkühlt, so daß die Temperatur im Rectum nicht über 15° ansteigt. Indessen hat uns die Erfahrung gelehrt, daß es im allgemeinen nicht notwendig ist, das Tier auf einer Kühlplatte zu lagern, weil die Operation eher fertig ist, als das Tier aufzuwachenbeginnt.)

Beschreibung der Apparatur.

Bei der Ausarbeitung des Cpp von Ratten ist besonders um ein geringes Ausmaß des äußeren künstlichen Blutkreislaufes Sorge zu tragen, weswegen man eine möglichst knappe Zirkulation im Arteriensystem sicherstellen muß, womit auch der Widerstand in den Gefäßen herabgesetzt wird; die Länge der äußeren Gefäßbahn entsprach etwa der doppelten Länge der Ratten. Zu dem Zwecke wurde der künstliche Kreislauf wie folgt hergestellt.

Um das System der künstlichen Gefäße möglichst kurz zu gestalten, wurde ein venöses Reservoir in einen Glaszylinder von 5 cm Durchmesser und 13 cm Länge eingebaut, welcher beiderseits mit Gummiverschlüssen gedichtet war. Neben dem venösen Reservoir wurde ein kleiner Zylinder angebracht, der dazu dient, an der künstlichen Aorta einen elastischen Widerstand zu schaffen, wie das auch sonst beim Cpp, z. B. vom Hunde, der Fall ist. Der Widerstand wird über 2 kleine Abzweigungen reguliert, die den kleinen Zylinder mit einem Manometer und einer Druckflasche verbinden. Der große Zylinder wird mit einem Ultrathermostaten

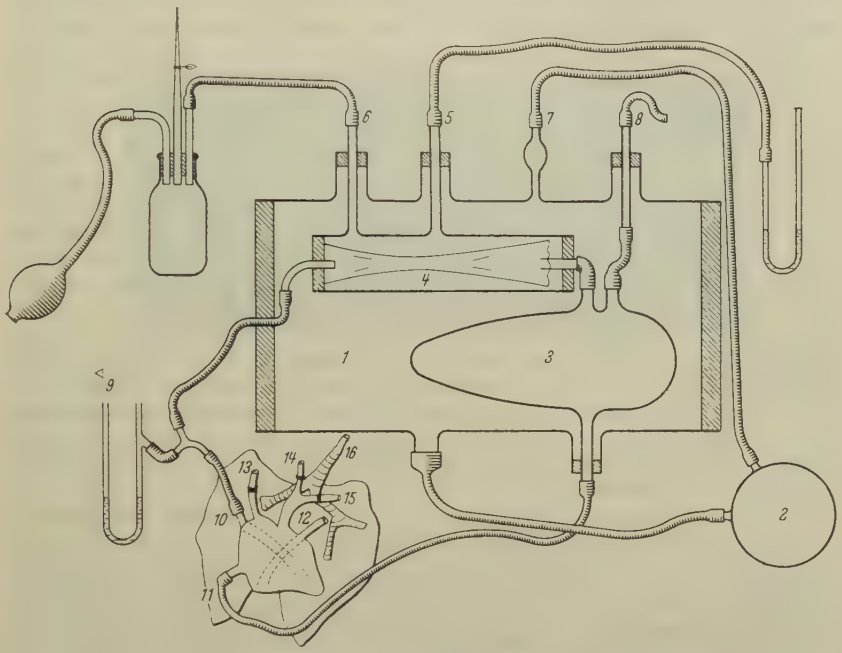


Abb. 1. *1* Glaszylinder; *2* Ultrathermostat; *3* Venöses Reservoir; *4* Kleiner Zylinder (zur Widerstandsregulierung); *5* Verbindung mit dem Quecksilbermanometer; *6* Verbindung mit der Druckflasche; *7* Verbindung mit dem Ultrathermostat; *8* Verbindung mit der atmosphärischen Luft; *9* Quecksilbermanometer (für die Druckmessung in der Aorta); *10* Ort für die Einführung der Kanüle in die Aorta; *11* Ort für die Einführung der Kanüle in die Vena cava caudalis; *12* Arteria pulmonalis; *13* V. cava cranialis dextra; *14* V. cava crainialis sinistra; *15* Abzweigung der V. cava cranialis sinistra; *16* Trachea.

verbunden, der eine ständige Temperatur von 38° sicherstellt. Das venöse Reservoir in Form eines Ellipsoids befindet sich in Höhe des Herzens der Ratte. Das Reservoir hat 3 Öffnungen: die untere zur Ableitung des Blutes in die rechte Vorkammer, die oberen zur Zufuhr des Blutes aus der Aorta und zur Verbindung mit dem Atmosphären-Druck. Auf dem Wege vom Arcus aortae zum Zylinder ist ein Quecksilbermanometer zur Registrierung des Aortendruckes eingebaut. Auf einen Windkessel wurde verzichtet.

Der Verlauf der Operation.

Für die Herrichtung des Präparates braucht man 2 große Ratten oder 1 große Ratte und 2 mittlere. Die größte wird für das Präparat benutzt, die beiden anderen dienen als Spender von Blut, das mit 5 cm^3 Tyrode-Lösung verdünnt wird, die

3 mg Heparin enthält. Die Spender werden dekapitiert. Insgesamt erhält man 15—20 cm^3 verdünnten Blutes, welches mittels einer Spritze in das venöse Reservoir gegeben wird. Für die künstliche Atmung wurde eine Starling-Pumpe verwandt, an die eine kleine Kanüle mit einer lichten Weite von 2 mm angeschlossen wurde, die in die Luftröhre eingeführt wird. Dann wird die Bauchhöhle sorgsam in der Regio epigastrica geöffnet. Die Öffnung wird erweitert und das Diaphragma ebenso sorgfältig geöffnet. Die Rippen beiderseits des Brustbeins werden durchtrennt. Das Sternum mit den beiderseits durchtrennten Rippen wird angehoben und halswärts zurückgeworfen. Danach wird behutsam die Vena Cava superior dextra freipräpariert und ein Faden unterlegt, dann wird die Vena cava superior sinistra präpariert und abgebunden (hierbei muß man sehr vorsichtig vorgehen, weil diese Vene unmittelbar den Venae pulmonales aufliegt und sie kreuzt, so daß die Venae pulmonales beim Durchziehen des Fadens leicht verletzt werden können). Gleichzeitig wird die Abzweigung der Vena cava cranialis sinistra, die von der linken Seite der Aorta aufsteigt, freigelegt und abgebunden (15). Das Präparieren der Vena cava inferior bringt keine Schwierigkeiten mit sich. Unter dieser werden 2 Fäden hindurchgezogen. Nach Präparierung der Venen wird die Aorta präpariert und ein Faden unter ihrem Bogen hindurchgezogen. Der schwierigste Teil des Experimentes ist die Einführung der Kanüle in die Vene. Die Vena cava sup. dextra wird unterbunden, sofern man nicht den Druck in der rechten Vorkammer zu messen wünscht; in die Vena cava inf. hingegen wird die Kanüle eingeführt, die mit dem venösen Reservoir in Verbindung steht. Nach Einführung der Kanüle beginnt das Herz infolge Zuganges von warmem Blut sofort schneller zu arbeiten. Nach einigen Schlägen des Herzens, währenddessen das Blut mit dem Heparin aus dem Reservoir in die Lunge eingelassen wird, wird mit Hilfe einer Klemme der Blutzufluß zum Herzen solange unterbrochen, bis man die Kanüle in die Aorta einführt; dann wird schnell durch Entfernen der Klemme das venöse Blut in den Kreislauf eingelassen. Das Herz erholt sich schnell.

Dank der Anwendung der Narkose durch Unterkühlung und mit Hypoxämie bleibt das Herz der Ratte sehr widerstandsfähig und hält eine längere Dauer der Präparierung aus, was bei Anwendung der Äthernarkose nicht der Fall ist. Die Bradycardie, die durch die Kühlung der Ratten entsteht, und die erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber der Anoxämie ermöglichen einen langsamen Verlauf der Präparation, was von großer Wichtigkeit ist, weil die Blutgefäße, besonders die Venen, ziemlich empfindlich sind und behutsam behandelt werden wollen. Falls beim Präparieren ein größeres Blutgefäß verletzt wird, und die Versuchsratte verblutet, braucht man die Arbeit nicht einzustellen, sondern man unterbindet das Gefäß und führt die Präparation zu Ende, weil das abgekühlte Herz auch nach der Ausblutung weiterarbeitet, wenn auch bedeutend schwächer; sobald aber warmes Blut aus dem Apparat zugeführt wird, nimmt es seinen Rhythmus wieder auf. Dank dieser Art von Narkose arbeitet jede Cpp-Ratte unter der Bedingung weiter, daß die Kanülen richtig in die Blutgefäße eingeführt wurden.

Abb. 2 zeigt die funktionelle Leistungsfähigkeit der Cpp-Ratte. Man sieht deutlich, daß durch Erhöhung des Widerstandes im Arteriensystem auch der arterielle Druck erhöht wird, wie auch, daß mit einer Herabsetzung des Widerstandes eine Verminderung des Druckes einhergeht. Sofern man das Herz durch Steigerung des arteriellen Druckes einem zu großen Widerstand aussetzt, wird dieses insuffizient, was man aus dem Bilde ersieht. Durch Heben des venösen Reservoirs wird der Blutzufluß gesteigert, doch wird das Herz schnell insuffizient. Nach

Senkung des venösen Reservoirs verbessert das Herz schnell wieder seine Arbeit. Die Frequenz kehrt kurze Zeit nach der Präparation (10—15 min) fast zum Normalen zurück: 250 Schläge min. Wird der Druck erhöht, bleibt die Frequenz die gleiche, was bedeutet, daß sich das Schlagvolumen erhöht hat, wie das STARLING bei der Erforschung des Cpp beim Hunde als Gesetz festgestellt hat. Damit ist erwiesen, daß das Cpp der Ratte unter festgelegten physiologischen Bedingungen arbeitet. Wenn das Cpp der Ratte voll wirksam und erwärmt ist, ver-

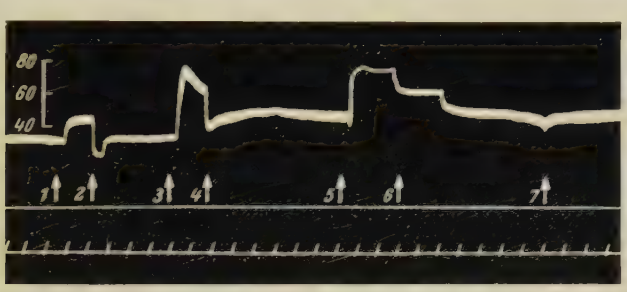


Abb. 2. *1* Steigerung des Widerstandes im arteriellen System um 15 mm Hg; *2* Herabsetzung des arteriellen Widerstandes um 20 mm Hg; *3* Steigerung des Widerstandes im arteriellen System um 45 mm Hg; *4* Herabsetzung des arteriellen Widerstandes; *5* Hebung des venösen Reservoirs; *6* Senkung des venösen Reservoirs; *7* Kurzfristige Unterbrechung der Atmung. Zeit in Minuten.

liert es seinen Widerstand gegenüber der Anoxämie, was man bei Nr. 7 im Bilde sieht, wo das Aufhören der Atmung momentan die Arbeit des Herzens schwächt.

Wir haben die abgekühlte Ratte in gleicher Weise für die Präparation des Herzens nach LANGENDORFF benutzt. Die LANGENDORFF-Methode am isolierten Herzen nähert sich dank dieser Methode in bezug auf die Leichtigkeit der Ausführung der STRAUBschen Präparation am Frosche.

Zusammenfassung.

Durch Anwendung der „Narkose", die man durch Unterkühlung verbunden mit Hypoxie erreicht, ist es gelungen, ein Cardio-pulmonal-präparat der Ratte auszuarbeiten. Dank dieser Methode kann man die Operation langsam und ohne Anwendung von Narkotika, sowie ohne Blutungsgefahr ausführen.

Literatur.

[1] ANDJUS, R.: Glas SS Srpske Akademije nauka-Odjelenje prirodno-matematićkih nauka. Nova serija 4. Beograd 1951. — [2–5] zit. nach [9]. — [6] GIAJA, I.: C. r. Acad. Sci. Paris **210**, 80 (1940). — [7] GIAJA, J. et R. ANDJUS: C. r. Acad. Sci. Paris **229**, 1170 (1949). — [8] HEUBNER, W.: Z. f. d. ges. exper. Med. **1**, 267 (1913). — [9] STAUB, H., u. K. BUCHER: Helvet. med. Acta Suppl. VII. [Beil. zu Bd. 8 (1941) Heft 6]. — [10] THER, L.: Pharmakologische Methoden. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m. b. H. 1949.

Prof. Dr. P. STERN,
Institut za Farmakologiju, Medicinskog Fakulteta, Sarajevo, Yougoslavia.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 338—348 (1953).

From the Chemical Division, Department of Medicine, The University of Chicago, and the Marine Biological Laboratory, Woods Hole.

The carbohydrate metabolism of heart slices* **.

By

E. S. Guzman Barron, Warren P. Sights and Violet Wilder.

With 3 figures in the text.

(Eingegangen am 27. Februar 1953.)

In 1921, Loewi[7] discovered the formation of acetylcholine by the frog heart when its vagus nerve was stimulated. He later found the enzyme which splits it[6, 19, 12]. These fundamental discoveries provided sound bases for subsequent researches on the chemical analysis of nerve activities. This chemical approach to physiologic phenomena has always been the guiding light of Professor Loewi's work[11]. The heart, which in the animal kingdom appeared in order to provide rapid transport of essential substances throughout the body, has changed its morphology from the primitive sac of the earthworm to the four-compartment organ of the mammal. It seems, however, that biochemical mechanisms utilized for the maintenance of the heart's work achieved their evolution rather early, and that the enzymatic mechanisms for the utilization of carbohydrates — the main source of energy — are similar whether in the primitive heart of invertebrates or in the more developed heart of mammals. The experiments presented in this paper, on the carbohydrate metabolism of the heart of several vertebrates and invertebrates, support this view.

Methods. — All hearts were obtained soon after death and were placed in ice-chilled mammalian Ringer solution prepared as described by Barron *et al*[3]. The hearts of human foetus were obtained from the Department of Obstetrics of this University. Those of sheep and cow were obtained from the stockyards of Swift & Company soon after death of the animals and were transported in ice; those of rat, rabbit, and dog from the animal rooms of the laboratory; and those of marine animals, at the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, where the experiments were performed. Slices, of a thickness of about 0.5 mm., were made by hand with thin razor blades. They were received, unless otherwise indicated, in ice-chilled mammaliam Ringer solution which was kept thoroughly oxygenated by bubbling oxygen. O_2 uptake and CO_2 measurements were made by the conventional Warburg methods with a fluid volume of 3 ml. After the experiments the slices were dried overnight at 105° and weighed. Determinations were

* Supported in part by the Douglas Smith Foundation for Medical Research of the University of Chicago, and the Biological Sciences Division, Office of Naval Research.

** In honor of Prof. Otto Loewi on his 80th birthday.

performed as follows: lactic acid, BARKER and SUMMERSON[2]; pyruvic acid and ketoglutaric acid, FRIEDEMANN and HAUGEN[8]; acetic acid, FRIEDEMANN[7]; citric acid, SPECK *et al*[16].

Effect of Ionic Environment and Anoxia. — On measuring the metabolism of mammalian tissue slices, WARBURG[19] chose as composition for the surrounding fluid that of blood serum, as provided in the RINGER solutions. It was found, however, that the respiration of the heart of marine animals, such as the dogfish (Cynias canis), limulus (Limulus polyphemus), and squid (Loligo pealii), was quite low when the tissue was suspended in a fluid with the electrolyte concentration of the blood or body fluid of the animal. The respiration increased considerably when the heart slices were suspended in mammalian RINGER (Table 1).

Table 1.

The Effect of Ionic Environment and O_2 Tension on the Respiration of Heart Slices.

Slices in 0.01 *M* glucose. Temp. 27°.

Species	Fluid in Vessel	Gas phase	Qo_2
Dogfish	Dogfish RINGER	Air	0.6
	Dogfish RINGER	Oxygen	1.0
	Mammalian RINGER	Air	2.4
	Mammalian RINGER	Oxygen	4.05
Limulus	Limulus RINGER	Oxygen	0.92
	Mammalian RINGER	Oxygen	1.24
Squid	Sea Water	Air	2.7
	Sea Water	Oxygen	4.2
	Mammalian RINGER	Air	4.5
	Mammalian RINGER	Oxygen	9.5

The metabolism of heart slices of rats is extremely sensitive to anoxia[5, 15], and its respiration is considerably more inhibited than the respiration of other organs. The heart of marine animals was also found very sensitive to changes in oxygen tension. Thus, the hearts of dogfish and of squid doubled their respiration when the gas phase of the WARBURG vessels was changed from air to oxygen. In fact, the oxygen uptake of the heart slices was maintained at a constant high value only when the slices were kept in ice-chilled mammalian RINGER with oxygen bubbling through it (Table 1).

The Temperature Coefficient of Heart Slice Respiration. — Although the temperature of poikylotherm animals varies greatly in land animals, in sea animals it is protected by the relative uniformity of the sea-water temperature. It could be expected, then, that the metabolism of the heart would remain without large variations within the limits of temperature change observed in the sea. The experiments indicate that this is the case. The respiration of heart slices of limulus, squid, and dogfish

increased little as the temperature was increased from 10° to 23° the temperature coefficient (Q_{10}) being about 1.5 (Table 2). The same results were obtained with the heart of dogfish up to 22°. When the temperature was raised beyond this value a distinctly different slope was obtained, the QO_2 values increasing more as the temperature was raised, so that the Q_{10} value rose to two from 25° to 40° (Figure 1). Thus two entirely different temperature coefficients were obtained.

Table 2. *The Temperature Coefficient of Heart Slice Respiration.* Slices in Mammalian Ringer-phosphate containing 0.01 *M* glucose.

Species	Temperature degrees	Q_{10}
Dogfish	10—20	1.67
	20—30	2.00
	30—40	1.90
Limulus	10—20	1.24
	20—30	1.50
Squid	20—30	1.53

Respiration and Anaerobic Glycolysis of Heart Slices. — The heart seems to be an organ which requires for its activity an essentially aerobic metabolism. In general, normal tissues possessing high aerobic metabolism have low anaerobic glycolysis, as was shown by the classic studies of Warburg[19]. The heart of rat follows this rule for the anaerobic glycolysis was half the value of respiration. The hearts of guinea pig and of dogfish showed equal values for respiration and glycolysis, whereas that of frog had an anaerobic glycolysis almost twice as much as respiration. The heart of scup (Stenotomus chrysops) also had an aerobic glycolysis greater than respiration. The same relationship was found in the heart of spider crab (Libini aemarginata). The heart of squid was a notable exception. At 26° the respiration was as high as that of the heart of rat, whereas the anaerobic glycolysis was only one third as high. The heart of human foetus showed the usual behavior of embryonic tissue, i. e., higher anaerobic glycolysis than respiration (Table 3).

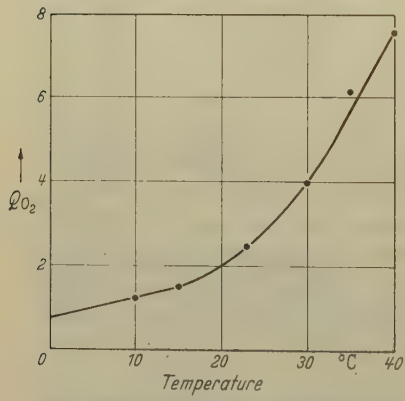


Fig. 1. The Change of heart respiration with temperature. Respiration of dogfish heart slices effect of temperature.

On measuring the anaerobic glycolysis of mammalian tissues, Warburg found that the CO_2 produced by the tissues in Ringer-bicarbonate

Table 3. *Respiration and Anaerobic Glycolysis of Heart Slices.*

Buffer: Mammalian RINGER-phosphate for respiration; RINGER-bicarbonate-N_2-CO_2 for glycolysis, p_H 7.4. Figures give c. mm. per mg. dry weight per hour.

Species	Temperature degrees	Q_{O_2}	$\frac{N_2}{Q_{CO_2}}$
Human Foetus	38	7.6	12
Rat	38	11.1	4.2
Frog	30	4.0	7.0
Guinea Pig	38	5.4	4.7
Dog Fish	26	4.4	4.7
Scup	26	2.2	3.9
Spider Crab	26	5.6	7.6
Limulus	26	3.3	4.1
Squid	26	12.0	3.7

saturated with N_2—CO_2 (95:5) was equivalent to their lactic acid production as measured chemically by its oxidation to acetaldehyde. The same equivalence was found in the heart of rat. However, this was not the case in the heart of invertebrates, where the CO_2 output far surpassed the lactic acid production as measured chemically. As an example,

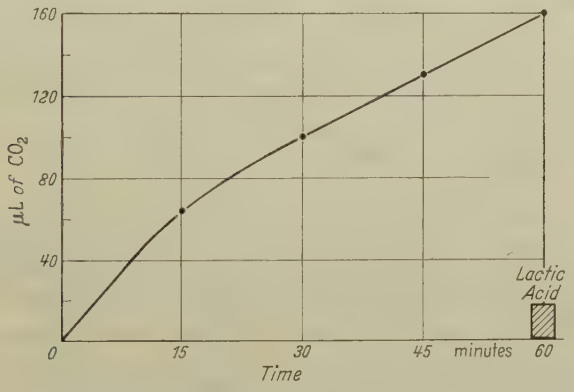


Fig. 2. Anaerobic Glycolysis of the Limulus Heart, as measured manometrically (CO_2 formation) and by lactic acid formation. Rate of CO_2 Production during glycolysis.

the values found in the heart of limulus are given in Figure 2; lactic acid production represented only 12.5 per cent of the CO_2 output in RINGER-bicarbonate.

The Metabolism of the Intermediates of the Citric Acid Cycle. — There is now general agreement that the aerobic metabolism of carbohydrates in animal tissues starts with the anaerobic split to pyruvic acid and oxidation of this acid *via* the citric acid cycle, although demonstration of this view has been provided only for mamalian tissues, and no studies have yet been made with invertebrate animals. In Table 4 are given

figures for the metabolism of pyruvate, acetate, succinate, α-ketoglutarate, and citrate for the mammalian heart (rat), the heart of fish (dogfish), and the heart of marine invertebrates (squid and limulus). There was in all of them utilization of these substrates and, except in the

Table 4. *The Metabolism of Intermediates of the Citric Acid Cycle by Heart Slices.* Buffer: Mammalian Ringer-phosphate. Substrate concentration, 0.01 *M*. Gas phase O_2. Temp. 38° for the rat experiments; 27° for the others. Figures give c. mm. per mg. dry weight per hour. Utilization of substrate per mg. dry wright per hour.

Substrate	Rat		Dogfish		Limulus		Squid	
	O_2	Util.	Qo_2	Util.	Qo_2	Util.	Q_2	Util.
None	11.1		4.1		2.6		9.2	
Acetate	16.1	3.0	4.5	2.8	3.3	4.0	13.5	3.8
Pyruvate	15.0	5.0	5.2	3.7	2.4	2.6	12.4	3.6
Succinate	25.8	—	8.5	—	7.2	—	18.2	—
α-Ketoglutarate	15.2	1.8	8.1	3.7	5.85	2.0	23.7	3.5
Citrate	12.7	2.2	5.8	1.2	4.1	2.1	23.0	5.0

limulus heart, increase in O_2 uptake on addition of pyruvate. There are some tissues which on addition of 0.01 M pyruvate (the concentration used in these experiments) show no increase in O_2 uptake although pyruvate is oxidized. Perhaps an increase in O_2 uptake would have been observed had the concentration of pyruvate been diminished.

Table 5. *The Metabolism of Pyruvate by Heart Slices.*

Oxidismutation Coefficients $\left(\frac{\text{Q-pyruvate in } O_2}{\text{Q-pyruvate in } N_2}\right)$

Buffer: in O_2 as gas phase, Mammalian Ringer-phosphate; in N_2:CO_2 as gas phase, Ringer-bicarbonate. p_H 7.4. Figures give c. mm. per mg. dry weight per hour.

Measurements	Rat	Dogfish	Limulus	Squid
QO_2	10.0	4.0	2.0	9.2
QO_2-pyruvate	12.0	5.04	1.95	11.7
Q-pyruvate	9.7	3.7	2.6	3.5
Q-CO_2	3.9	0.8	3.36	3.8
Q-CO_2-pyruvate	5.0	0.9	4.12	6.9
Q-pyruvate	5.2	1.7	2.5	3.4
$\frac{\text{Q-pyruvate in } O_2}{\text{Q-pyruvate in } N_2}$	1.86	2.17	1.04	1.03

The Metabolism of Pyruvate. — Of all the intermediates of carbohydrate metabolism pyruvic acid is the most reactive. Under anaerobic conditions it may undergo dismutation to acetic and lactic acids and CO_2, and under aerobic conditions it may be oxidized to acetic acid. Some tissues can perform both processes, while others can do only one or the other.

Although the heart can utilize pyruvate either aerobically or anaerobically, the oxidismutation coefficient $\left(\frac{\text{Q-pyruvate in } O_2}{\text{Q-pyruvate in } N_2}\right)$ varied from species to species. In the heart of the vertebrates (rat, dogfish) the aerobic utilization of pyruvate was greater than the anaerobic utilization, whereas in the invertebrate heart (limulus, squid) there was no difference (Table 5).

Table 6. *The Effect of Oxygen Tension on Acetate Metabolism.*
Buffer, RINGER-phosphate p_H 7.4. Sodium acetate, 0.01 *M*. Figures give c. mm. of acetate utilized per mg. dry weight per hour. All experiments at 38°, except squid which was at 26°.

Species	Q_{O_2}		Acetate Utilization	
	In Air	In Oxygen	In Air	In Oxygen
Rabbit	12.3	15.8	3.1	7.1
Rat	7.2	16.2	0.8	3.6
Pigeon	10.1	14.0	1.0	3.4
Squid	7.1	13.5	1.2	3.8

The Metabolism of Acetate. — The acetate produced during the oxidation of pyruvate condenses with oxalacetate to give citric acid when the pathway of its metabolism is *via* the citric acid cycle. The utilization of acetate by the heart is rather vigorous, as was shown by BARCROFT *et al*[1], who found that rabbit hearts perfused with LOCKE's solution containing acetate could be maintained beating twice as long as when perfused with the solution lacking acetate. The metabolism of acetate by

Table 7. *Effect of Thiol Inhibitors on the Acetate Metabolism of Rabbit Heart (mince).*
Buffer, RINGER-phosphate p_H 7.4. Acetate, 0.01 *M*. O_2 as gas phase. Values give c. mm. per mg. dry weight per hour.

Inhibitor	Concn. M	O_2 Uptake		Acetate Utilization	
		Inhibitor	Control	Inhibitor	Control
p-Cl-Hg benzoate . . .	10^{-3}	1.0	18.9	2.13	8.88
„ „ . . .	2.5×10^{-4}	11.0	14.5	5.42	7.11
„ „ . . .	5×10^{-4}	2.4	13.8	1.81	6.67
Arsenite	1×10^{-3}	1.85	15.5	1.95	7.26
„	5×10^{-4}	3.4	14.8	2.13	6.10

the heart is greatly influenced by the oxygen tension. In fact, BERNHEIM[5] found no increase in the O_2 uptake on addition of acetate to rat heart alices where the gas phase of the WARBURG vessels was air. We have confirmed BERNHEIMs findings. However, when the RINGER solutions were saturated with oxygen and the gas phase was oxygen, respiration of rat heart slices was increased 48 per cent on addition of acetate.

Similar findings were obtained with rabbit, sheep, beef, and dog heart. The hearts of all animals examined increased their respiration when the slices were kept in oxygen-saturated solutions (Table 6).

In the citric acid cycle, the metabolism of acetate starts with the conversion of acetate into acetyl-coenzyme A, a conversion which, according to Lynen[13], occurs through the — SH groups of coenzyme A:

$$CH_3COOH + CoASH \rightleftharpoons CoAS — COCH_3 + H_2O.$$

If this reaction is also the first step in the metabolism of acetate in the heart, there will be inhibition of acetate utilization on addition of thiol reagents. Addition of arsenite and of p-ClHg benzoic acid did inhibit the utilization of acetate by rabbit heart (Table 7).

Table 8. *The Metabolism of Acetate by Heart Slices.*

Buffer, Mammalian Ringer-phosphate, p_H 7.4, Gas phase, O_2. Temp. 38° (Those marked with asterisk were calculated values from data obtained at 20° and at 35°.) Figures give c. mm. per mg. dry weight per hour.

Species	Qo_2	Qo_2-Acetate	Q-Acetate
Human foetus	8.2	9.1	4.3
Rat	11.1	16.2	3.6
Rabbit	10.7	15.8	7.1
Beef	7.7	8.9	4.5
Sheep	9.6	11.2	3.4
Pigeon	14.0	15.0	3.4
Dogfish	6.9	7.6	4.2
Spider crab*	12.0	—	—
Limulus*	3.8	4.7	3.0
Squid*	15.6	22.7	5.7

Table 9. *Synthesis of Citric Acid by Heart Slices.*

Buffer, Mammalian Ringer-phosphate, p_H 7.4. Acetate and oxalacetate, 0,01 *M*. Gas phase O_2. Time of incubation, 1 hour, Figures give c.mm. per mg. dry weight per hour.

Species	Temperature degrees	Qo_2 No substrate	Substrate	Citrate Synthesis
Pigeon	38	9.0	13.0	7.0
Rabbit	38	8.0	12.0	5.8
Dogfish	28	3.4	7.0	2.4
Limulus	28	2.1	5.0	2.8
Squid	28	9.0	27.0	3.3

The respiration of the hearts of all animals examined increased on addition of acetate; the lowest increase was found in the heart of human foetus. They all utilized acetate rather rapidly (Table 8).

Citric Acid Synthesis and Utilization. — Definite evidence that the metabolism of acetate in the heart proceeds *via the* citric acid cycle is

obtained by demonstration of citric acid synthesis on addition of acetate and oxalacetate and by utilization of added citrate. The presence of the enzyme for the first reaction was demonstrated by OCHOA[14], who prepared the crystalline „condensing" enzyme from pig heart. The oxidation of citric acid by sheep heart was found by SMYTH[18]. The O_2 uptake of all hearts studied was greatly increased on addition of acetate and oxalacetate, and the formation of citric acid was found in all of them (Table 9). The rate of oxidation of citric acid varied greatly. In the heart

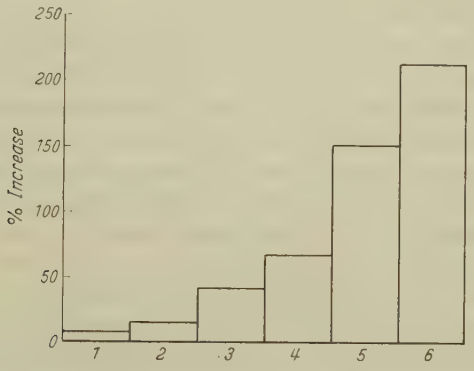


Fig. 3. Effect of citrate on heart respiration % Increase of Q_{O_2}.
1 Human fetus, *2* Rat, *3* Dogfish, *4* Limulus, *5* Spider crab, *6* Squid.

of vertebrates (human foetus, rat, dogfish) the increase was never beyond 50 per cent, whereas in the heart of invertebrates (limulus, spider, crab, squid) addition of citrate increased the oxygen uptake from 60 per cent to 200 per cent (Figure 3).

Discussion.

From the studies presented here can be drawn certain conclusions correlated with the phylogenetic development of enzyme systems and with the regulatory mechanisms of cellular metabolism.

In the comparative study of carbohydrate metabolism in the heart, the results obtained on anaerobic glycolysis must be separated from those on the oxidative pathway. On measuring anaerobic glycolysis of marine invertebrate heart it was found that lactic acid was not the only end product; there was formation of some other acids as shown by the extra CO_2 output in the manometric determinations of glycolysis. In the mammalian heart (rat, human foetus) the CO_2 produced anaerobically in RINGER-bicarbonate was equivalent to lactic acid formation. The nature of the other acids is still unknown; perhaps they are organic phosphoric acids, as it was found on studying the anaerobic glycolysis

of skeletal invertebrate muscle[4]. In the oxidative phase it seems that the heart, from its first appearence in the animal kingdom, has started with all the enzymes for carbohydrate oxidation *via* the citric acid cycle: all the hearts utilized the different intermediates of the cycle, and synthesized citric acid on addition of acetate and oxalacetate. However, there was great variability on the rate of oxidation of citric acid (Figure 3): low in the heart of vertebrates, it was very high in the heart of invertebrates. Whether this difference is due to unequal distribution of citric acid oxidase or is due to the presence in vertebrate hearts of mechanisms which regulate the rate of citrate oxidation is not known.

The heart is essentially an aerobic organ and its respiration is profoundly disturbed under conditions of anoxia that would have no effect at all in other tissues (with the exception perhaps of the brain). Moreover, according to Bernheim[19] anoxia produces an irreversible effect: the inhibited respiration of the heart kept under anoxic conditions for a short time is not restored to normal on saturation with oxygen. The findings of Bernheim on the mammalian heart (rat) were also observed in all the hearts studied here where respiration in air was always lower than in oxygen. This inhibiting effect of anoxia on heart respiration seems to be due to inhibition of acetate utilization. In fact it was found that acetate utilization, low in heart slices kept in air, increased rapidly when the suspension fluid and the gas phase was saturated with oxygen. The precise mechanism of this inhibition is puzzling, since the enzyme for the condensation of acetate with oxalacetate to give citric acid („condensing" enzyme and coenzyme A) requires no oxygen.

In marine animals where the temperature of the individual is determined by the temperature of the sea, there exists a mechanism whereby the respiration of the heart is maintained at about the same level at temperature fluctuations observed in the sea. The temperature coefficients are about 1.5. It is only when the temperature is increased beyond the maximum temperature of the sea that the respiration of the heart increased considerably so that a temperature coefficient, Q_{10}, of 2 was reached. On plotting the variations of the O_2 uptake with temperature there are thus obtained two separate rates of reactions; slow up to 24°, fast from 24° to 40° (Figure 1). The tangent from these two curves meets at a point which, when projected to the abscissa, gives the maximum temperature observed in the sea, on the American Atlantic. The regulatory mechanisms are thus effective at the temperatures observed in the environment; beyond the environmental temperature all regulation ceases and we have then the uninhibited increase of enzymatic reactions with the increase in temperature. Although we know that this regulatory mechanism must exist within the tissue itself — since the observations were made in tissue slices — we are still ignorant about their nature.

The experiments on the influence of the ionic environment on heart respiration, baffling at superficial examination, become more understandable on observing the remarkable constancy of electrolyte concentration inside the muscle observed by STEINBACH[17]. Species as varied as squid, grasshopper, and cat had in their skeletal muscle about the same concentration of sodium and potassium. The respiration of the heart of marine animals was much higher and more constant in mammalian RINGER than in fluids with the electrolyte concentration of their own fluids. Perhaps the low rate of respiration when the heart slices are suspended in fish-RINGER, or sea water is due to high concentration of Na for it is known that Na inhibits a number of enzyme reactions that take place in the metabolism of carbohydrates. Although no data are available on the Na-K concentrations of the heart of different animal species, it is justifiable to assume that it has the same constancy as has been found by STEINBACH in skeletal muscle.

Of all hearts studied, the heart of squid showed the greatest activity, not only when compared with other invertebrate hearts but also with the hearts of birds and mammals. Its respiration and rate of citrate oxidation were the highest of all hearts studied, its respiration values approaching those found in highly respiring mammalian tissues.

Summary.

From a comparative study of the carbohydrate metabolism of some vertebrate and invertebrate hearts it was found that anaerobic glycolysis, which in the mammalian heart ends with lactic acid formation, in the heart of invertebrates produced other acids besides lactic acid. The oxidation phase was essentially similar in all, namely oxidation *via* the citric acid cycle.

All hearts were extremely sensitive to anoxia, and the rates of respiration in air were always lower than in oxygen. This inhibition of respiration is attributed to lack of acetate oxidation.

The rate of respiration of the heart of marine animals changed little with temperature fluctuations between 10° and 24°. Respiration increased markedly from 24° to 40°.

The heart of squid was found to have the highest respiration and citrate oxidation.

Literature.

[1] BARCROFT, J., R. MCANALLY and A. PHILLIPSON: Nature **151**, 304 (1943). — [2] BARKER, S. B., and W. H. SUMMERSON: J. of Biol. Chem. **138**, 535 (1941). — [3] BARRON, E. S. G., J. MEYER and Z. B. MILLER: J. Investigat. Dermat., Baltimore **11**, 97 (1948). — [4] BARRON, E. S. G., and T. N. TAHMISIAN: J. Cellul. Comp. Physiol. **32**, 57 (1948). — [5] BERNHEIM, F., and M. L. C. BERNHEIM: Amer. J. Physiol. **142**, 195 (1944). — [6] ENGELHARDT, E., and O. LOEWI: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **150**, 1 (1930). — [7] FRIEDEMANN, T. E.: J. of Biol. Chem. **123**, 161 (1938). — [8] FRIEDEMANN, T. E., and G. E. HAUGEN: J. of Biol. Chem. **147**, 413 (1943). — [9] LOEWI, O.: Arch. Physiol., Bonn **189**, 239 (1921). — [10] LOEWI, O.:

Arch. Physiol., Bonn **193**, 201 (1922). — [11] Loewi, O.: in Modern Trends in Physiology and Biochemistry, Barron, E. S. G. ed. New York, 1952, p. 405. — [12] Loewi, O., and E. Navratil: Arch. Physiol., Bonn **210**, 678 (1922). — [13] Lynen, F., E. Reichert and L. Rueff: Ann. der Chemie **574**, 1 (1951). — [14] Ochoa, S., J. R. Stern and M. C. Schneider: J. of Biol. Chem. **193**, 691 (1951). — [15] Pearson, O. H., A. B. Hastings and H. Bunting: Amer. J. Physiol. **158**, 251 (1949). — [16] Speck, J. G., J. W. Moulder and E. Evans jr.: J. of Biol. Chem. **164**, 119 (1948). — [17] Steinbach, H. B.: in Modern Trends in Physiology and Biochemistry, Barron, E. S. G., Ed., New York, 1952, p. 173. — [18] Smyth, D. H.: Biochemic. J. **34**, 1046 (1940). — [19] Warburg, O.: Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926.

Dr. E. S. Guzman Barron,
University of Chicago, Department of Medicine, Chicago 37, Illinois.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 349—351 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München.

Eine neue Apparatur zur exakten Registrierung der Frequenz des isolierten Froschherzens mittels Ordinatenschreibung*.

Von

A. W. Forst und K. Heuwing.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. Februar 1953.)

Die Festlegung der Schlagfrequenz des nach Straub isolierten Froschherzens ist bei Aufzeichnung des üblichen Mechanogramms nur bei relativ rascher Umdrehung der Trommel des Kymographions möglich, jedoch auch nur unter Verzicht auf ausreichende Genauigkeit. Verschiedene Untersuchungen am isolierten Froschherzen, die eine Erkennung und Messung auch geringfügiger Veränderungen der Schlagfrequenz wünschenswert machten, waren Veranlassung zur Schaffung einer geeigneten Apparatur, die der eine von uns (H.) erdacht und gefertigt hat. Nach vielfacher Abänderung und Verbesserung hat sie in der nachfolgend beschriebenen Form eine praktisch erprobte Gestalt gefunden.

Aufgabenstellung. Als Aufgabe gewählt wurde die Festlegung der beendeten Herzkontraktion in der Zeiteinheit. Die zu bewältigende Schwierigkeit lag in der Forderung, die oft sehr kurzen zeitlichen Abstände der einzelnen Herzkontraktionen über längere Zeiträume hinweg mit einem handlichen Gerät exakt zu messen. Diese Schwierigkeit konnte mit dem nachfolgend beschriebenen Ordinatenschreiber überwunden werden.

Beschreibung des Gerätes. Das Prinzip des Gerätes beruht auf folgenden Eigenheiten: Die Entspannung des Herzens bewirkt über den Schreibhebel, der die Kontraktionen auf die Trommel schreibt, die sofortige Schließung eines Quecksilberkontaktes, der bis zum Beginn der Kontraktion des Herzmuskels geschlossen bleibt. Ein weiter unten beschriebener Mechanismus formt diesen, während der Zeitdauer der Herzentspannung bestehenden, verschieden lang anhaltenden Stromschluß in einen stets gleich langen, kurzen Stromimpuls um, der zur Steuerung der nachfolgend erklärten Einrichtung dient.

Zum Verständnis der nun folgenden Ausführungen über die Wirkungsweise des Ordinatenschreibers selbst dient die beigefügte Abbildung 1. In einem Gehäuse ($10 \times 10 \times 20$ cm) wirkt ein frequenzstabilisierter Allstrommotor über ein Getriebe auf das Zahnrad *(1)* derart, daß dieses in der Sekunde genau eine Umdrehung macht, wobei die Umdrehungszahl zu Justierungszwecken in kleinen Grenzen variiert werden kann. Auf der Achse des Rades *(1)* sitzt, durch entsprechende Federn gehemmt, eine mit 5 Einschnitten versehene Scheibe *(1a)*. Die am Ende des

* Herrn Prof. O. Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

Hebels *(2)* angebrachte Sperrklinke greift in einen dieser Einschnitte ein, und hindert somit die Scheibe an der Rotation des stets in Gang bleibenden Getriebes teilzunehmen. Gleichzeitig drückt die Feder *(3)* die Rolle *(4)* gegen die Schubstange *(5)*, die von dem Rade *(6)* des Getriebes nach oben durch Reibung mitgenommen wird. Die an der Schubstange in geeigneter Weise angebrachte Schreibfahne bewirkt die Aufzeichnung der Ordinate auf eine sich mit konstanter Geschwindigkeit drehende Trommel.

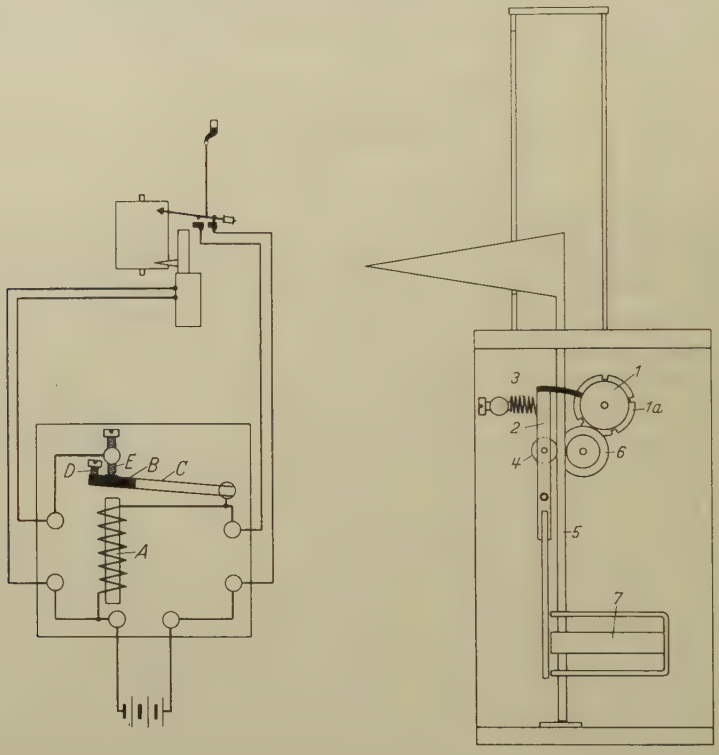


Abb. 1.

Erfolgt nun ein den oben gemachten Ausführungen entsprechender kurzer Stromimpuls, so zieht der Elektromagnet *(7)* den Hebel *(2)* an, wodurch die Sperrklinke aus dem Einschnitt der Scheibe genommen wird und diese so lange an der Rotation teilnehmen kann, bis die Sperrklinke unter dem Einfluß der Feder *(3)* in den nächsten Einschnitt eingreift. Da während der Rotationszeit der Scheibe *(1a)* — $^1/_5$ sec — die Rolle *(4)* die Berührung mit der Schubstange verliert, fällt diese unter dem Einfluß ihrer Schwere in die Ausgangsstellung zurück. Eine in der Zeichnung nicht sichtbare Feder bewirkt überdies eine beschleunigte Rückführung der Schubstange. Sobald die Sperrklinke in den nächsten Einschnitt eingefallen ist, beginnt der Transport der Schubstange von neuem.

Bei Entspannung des Herzmuskels wird also die Schubstange auf ihr Nullniveau fallen, um dann mit gleichmäßiger Geschwindigkeit bis zur nächsten Entspannung anzusteigen.

Die Länge des einzelnen Ordinatenstriches stellt somit die Dauer einer Periode dar, während die Lage des einzelnen Striches auf der Abszisse die Feststellung seiner zeitlichen Orientierung während des Beobachtungszeitraumes erlaubt. Die Zeitdauer von $^1/_5$ sec genügt, um ein Zurückfallen der Schubstange auf das Nullniveau auch von der obersten Stellung zu gewährleisten. Da die Schreibfahne stets mit einer Verspätung von genau $^1/_5$ sec zu schreiben beginnt, muß die absolute Nullinie im Koordinatensystem um $^1/_5$ sec tiefer als die Grundlinie der Schreibfeder gelegt werden; sie wird durch eine eigene, einstellbare Feder gezeichnet.

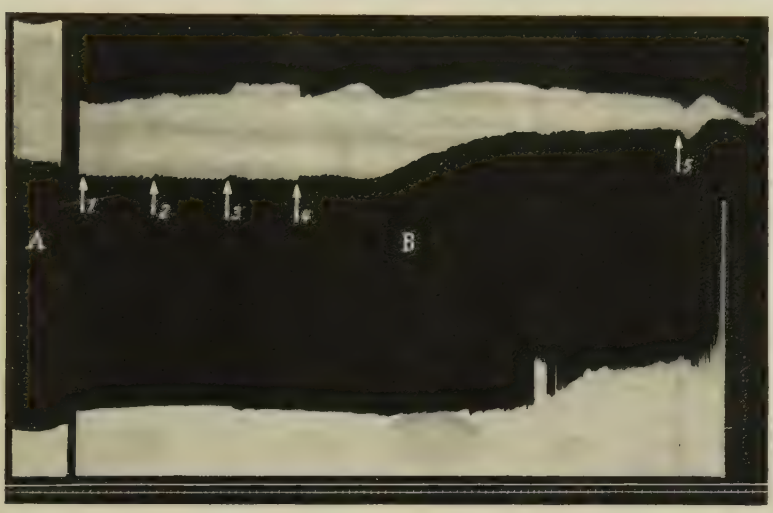


Abb. 2. Isoliertes Froschherz. *A* Aktion normal, *B* Aktion nach Schädigung. Bei *1, 2, 3* 1 cm³ RINGER + 0,1% Glucose. Bei *4* und *5* 1 cm³ RINGER + 0,1% Glucose + 0,5 γ K-Strophanthin.

Um verschiedene Schreibhöhen erhalten zu können, sind mehrere Zahnräder für den Friktionsbetrieb vorgesehen. Mit 4 Zahnrädern verschiedener Größe werden folgende Schreibgeschwindigkeiten erreicht: 10, 25, 50 und 100 mm/sec.

Der Mechanismus zur Umwandlung eines verschieden langen Stromschlusses in einen stets gleichlangen, kurzen Stromimpuls ist folgender: Wie aus Abb. 1a ersichtlich, liegt in Reihe mit dem Quecksilberschalter eine 6 Volt-Batterie, und eine hochohmige Magnetspule *(A)*. Im Nebenschluß zur Magnetspule liegt über die Kontaktfeder *(C)*, bzw. die Kontaktschraube *(E)* der in Abb. 1b erwähnte Elektromagnet *(7)*. Bei Schließung des Quecksilberschalters wird nun einerseits die Magnetspule *(A)* den Anker *(B)* anziehen und andererseits der im Nebenschluß liegende Elektromagnet *(7)* einen Stromimpuls erfahren, der aber nur von so langer Dauer ist, bis der von der Magnetspule *(A)* angezogene Anker *(B)* den Nebenstromkreis an der Kontaktschraube *(E)* unterbrochen hat.

Die Fehlergrenze des beschriebenen Gerätes liegt unter $\pm$ 1%. Der Apparat kann auch zur Schreibung anderer Frequenzen verwendet werden.

Dr. A. W. FORST, Pharmakologisches Institut der Universität München.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 352—361 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut Göttingen
(Direktor: Professor Dr. L. Lendle).

Über die Herzvaguswirkung unter dem Einfluß von Digitalisglykosiden* **.

Von
L. Lendle, H. Mercker und H. Rohr.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. Februar 1953.)

Die therapeutische wie die toxische Digitalis-Bradykardie werden meist noch mit dem hemmenden Einfluß des Vagus auf die Herztätigkeit in Verbindung gebracht, obwohl wenigstens für die therapeutische Digitaliswirkung am insuffizienten dilatierten Herzen schon allein mit der Besserung der Herzmuskelleistung ohne Wirkung über den Vagus die Gründe für die Tachykardie entfallen.

Bei der Digitalistherapie können jedoch auch durch Kumulation Herzfrequenzen unter der Norm erreicht werden: man spricht dann von einer „toxischen" Bradykardie, die auch bei einmaligen hohen Dosen ausgelöst werden kann.

Die Ergebnisse der tierexperimentellen Arbeiten lassen sich wohl nicht unmittelbar mit den therapeutischen Digitaliswirkungen bei der Herzinsuffizienz und Vorhofflattern vergleichen, sie können aber zum Verständnis der Wirkungsweise beitragen. Man hat daher schon immer bei der pharmakologischen Analyse der Kreislaufwirkung von Digitalisglykosiden deren Einfluß auf die Herzfrequenz beachtet und zu klären versucht. Zusammenfassende Darstellungen dieser Frage finden sich mehrfach in der Literatur (Lendle; Gremels; Heymans und Heymans; Zipf u. Ehrlicher). Es erscheint nicht angebracht, die Befunde der verschiedenen Autoren erneut zusammenzustellen. Dagegen sollen einige mögliche Einwände bezüglich der Methodik, mit welcher die experimentellen Ergebnisse gewonnen wurden, und der Deutungen der Befunde erörtert werden.

In Frage kommen drei Hauptangriffspunkte für die Auslösung der Digitalisbradykardie:

1. Die Bradykardie ist „reflektorischer" Natur, d. h. sensible Receptoren (im Herzmuskel oder Pressoreceptoren) werden erregt oder gegenüber den normalen Reizen sensibilisiert (Heymans, Bouckaert und Régniers; Zipf und Ehrlicher).

---

* Herrn Professor Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

** Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

2. Das Vaguszentrum wird erregt.

3. Die Vaguswirkung auf den Sinusknoten des Herzens wird verstärkt. Gremels spricht von einer „Erregbarkeitssteigerung des Vagus".

Zu 1. Auf den reflektorischen Charakter der Digitalisbradykardie wird verschiedentlich auf Grund des Befundes geschlossen, daß Durchtrennung der zentripetalen Nerven von solchen Receptoren die Bradykardie aufhebt oder nicht auftreten läßt (Heymans, Bouckaert und Régniers; Zipf und Ehrlicher). Dieser Schluß ist nun nicht ganz beweisend, da der Vagustonus reflektorisch von pressosensiblen Zonen unterhalten und mit der Durchtrennung solcher Nerven ausgeschaltet wird. Eine Sensibilisierung des Herzens für den Vaguseinfluß könnte also verborgen bleiben. Dieser Einwand wurde auch von Abdon und Nielsen erhoben. Sie führten ihre Versuche daher so durch, daß sie den isolierten Carotis-Sinus mit Lösungen von Digitalisglykosiden durchströmten und den Erfolg einer Druckänderung im Sinus auf Blutdruck und Pulsfrequenz beobachteten. Sie haben unter diesen Bedingungen keine Erregung oder Sensibilisierung der Presso- und Chemoreceptoren durch Digitalisglykoside gefunden. Andererseits erwähnen Heymans, Bouckaert und Régniers, daß nach Ouabain die reflektorische Bradykardie bei Druckerhöhung im Carotis-Sinus verstärkt ist, ohne allerdings in der zitierten Mitteilung experimentelles Material beizubringen. Man muß also die Frage einer Steigerung von Kreislaufreflexen nach Digitalisglykosiden noch offen lassen.

Zu 2. Die Möglichkeit der Erregung des Vaguszentrums durch Digitalisglykoside dürfte auf Grund der Ergebnisse von Heymans und Heymans (Methode der isolierten Durchströmung des Kopfes eines Hundes) auszuschließen sein.

Zu 3. Gremels hat namentlich die Verstärkung der Vaguswirkung auf die Herzfrequenz durch Digitalisglykoside betont.

Da anzunehmen ist, daß bei der Vaguswirkung Acetylcholin als Überträgerstoff wirkt, wurde auch die Wirkung von Acetylcholin auf die Herzfrequenz nach Digitalisglykosiden geprüft. Die Befunde sind jedoch widersprechend. Abdon, Hammarskjöld und Nielsen beschreiben eine Sensibilisierung gegenüber Acetylcholin durch Strophanthin sowohl am Froschherzen* (Straub-Herz) als auch am perfundierten Kaninchenherzen. Am Warmblüterorganismus wurde die Frage der Sensibilisierung gegenüber Acetylcholin auch von Lendle und Wienke untersucht. Bei intravenöser Applikation von Acetylcholin vor und nach Gabe von Digitalisglykosiden und Beobachtung der Herzfrequenz (EKG) fanden sich keine Anhaltspunkte für eine Sensibilisierung.

Gegen diese Versuche ließe sich vielleicht vorbringen, daß die Perfusion des Herzens mit Acetylcholinlösungen oder die i. v. Injektion von Acetylcholin nicht der natürlichen Vaguserregung entsprechen und daß die elektrische Reizung des Herzvagus, wie sie von Gremels angewandt wurde, eher den natürlichen Verhältnissen nahekommt, weil bei der Acetylcholininjektion auch der periphere Kreislauf betroffen ist und sympathische Gegenregulationen mit Steigerungen der Herzfrequenz ausgelöst sein könnten.

Die Bedenken, die nun unseres Erachtens bei der Versuchsanordnung von Gremels zu erheben sind, betreffen die Methodik der Vagusreizung. Gremels führte die Vagusreizungen durchweg mit verhältnismäßig hohen Reizfrequenzen durch (Wechselstrom von 40 Hertz) und benutzte Stromstärken, die im Bereich der Schwellenstromstärke oder etwas darüber lagen. Bei dieser Art der Reizabstufung wird ein (in seiner

* Dies wurde von verschiedenen Autoren nicht bestätigt (vgl. Lit. bei Hohensee und Lendle; neuerdings Zinnitz).

Größe wechselnder) Teil der für den Reizerfolg maßgebenden Nervenfasern erregt. Die übliche Anordnung der Reizelektroden am Nervenstamm bringt es mit sich, daß sehr leicht Lageänderungen der Elektroden oder Änderungen der Nebenschlüsse (z. B. bei Blutungen) für den Reizstrom eintreten. Dadurch wird aber die Stromverteilung im Nerven und damit die Zahl der erregten Fasern (bei untermaximaler Reizung) geändert. Nach unseren Erfahrungen läßt sich auf diesem Weg der Vagusreizerfolg im Experiment nur selten über längere Zeiten leidlich konstant halten.

Der andere mögliche Weg, durch Änderung der Reizimpulszahl pro Sekunde bei für den Nerven maximaler Reizstromstärke die Vagusreizung abzustufen, erscheint uns zweckmäßiger. Hierbei kann man durch eben übermaximale Stromstärken Einflüsse auf die Stromverteilung im Nerven weitgehend ausschließen. Die niederen Reizimpulsfrequenzen (0,5—2/sec) erlauben außerdem Dauerreizungen durchzuführen und damit einen „Vagustonus" im Experiment nachzuahmen. Ferner dürften niedere Reizimpulsfrequenzen auch eher den bei der natürlichen Innervation auftretenden Erregungsfrequenzen in vegetativen Fasern (vgl. Folkow) entsprechen. Es erschien uns daher angezeigt, unter diesen Gesichtspunkten die Frage der Vaguswirkung auf die Herzfrequenz unter dem Einfluß von Digitalisglykosiden erneut zu überprüfen.

Methodik.

Die Versuche wurden an Hunden in Morphin-Chloralose-Urethan- und an Katzen in Chloralose-Urethan-Narkose durchgeführt. (Dosierung: Hunde: Morphin 2,0—4,0 mg/kg, 4%ige Lösung s. c., Chloralose 0,08 g/kg, Urethan 0,25 g/kg; Katzen: Chloralose 0,06 g/kg, Urethan 0,25 g/kg.) Chloralose und Urethan wurden zusammen in 2 cm^3/kg 0,9%iger NaCl-Lösung unter Erwärmen gelöst; die etwa 37° warme Lösung wurde i. m. injiziert, um eine möglichst gleichmäßige Narkose zu erzielen. Wenn erforderlich, wurde nach zwei Stunden bei Operationsbeginn noch Urethan nachgegeben, im allgemeinen 2 cm^3/kg der 25%igen Lösung i. m. = 0,5 g/kg.

Bestimmt wurden: Der arterielle Druck in einer Arteria femoralis mit dem Wismutmanometer nach Hampel und die Pulsfrequenz. Die Pulsfrequenzwerte wurden teils durch Auszählen der pulsatorischen Blutdruckschwankungen (direkte Beobachtung oder Lupenvergrößerung der optisch registrierten Blutdruckkurve) gewonnen oder mit einem Pulsfrequenzmesser für optische Registrierung zusammen mit dem Blutdruck aufgezeichnet. Dieser wurde an die zweite Arteria femoralis angeschlossen. Das Prinzip dieses Gerätes besteht darin, daß die pulsatorischen Blutdruckschwankungen mit Hilfe eines Kohlendruckwiderstandes in Spannungsschwankungen transformiert werden, die über eine Verstärkerstufe und Thyratron Kondensatorentladungen auslösen. Der Mittelwert des Ladestromes des Kondensators wird mit einem Galvanometer registriert. Der Ausschlag steht in linearer Abhängigkeit von der Pulsfrequenz. Technische Einzelheiten des Gerätes werden in einer besonderen Mitteilung beschrieben werden.

Die Vagi wurden beiderseits durchtrennt und der rechte periphere Vagusstumpf in eine Ludwigsche Reizelektrode eingelegt. Zur Reizung benutzten wir einen

Impulsgenerator („Megatest" nach KROEBEL). Bei den Reizungen erfolgte die Abstufung des Reizerfolges durch Änderung der Reizimpulszahl pro Sekunde, während Stromstärken angewandt wurden, die für den Nervenstamm maximal waren. Durch Reizimpulsfolgefrequenzen von 0,5—2/sec lassen sich nach unseren Erfahrungen Änderungen der Pulsfrequenz um 20—50% (bezogen auf die Ausgangsfrequenz) erzielen (vgl. ERDMANN und MERCKER). Bei diesen niederen Reizimpulsfolgefrequenzen beobachteten wir auch keine heterotope Erregungsbildung im Herzen, was bei stärkeren Vagusreizungen (d. h. höheren Reizimpulsfolgefrequenzen von 10/sec) der Fall sein kann. Außerdem ist bei Reizimpulsfolgefrequenzen von 0,5—1/sec kein Wiederanstieg der Herzfrequenz während der Reizung (sogen. „escape") zu beobachten. Die Reizungen erfolgten entweder als Dauerreizungen über etwa 1½ Std oder in rhythmischer Folge für 1—2 min. Letztere Methode hat den Vorteil, daß man Veränderungen der Herzfrequenz ohne Vagusreizung in den Zwischenperioden erfaßt.

In einem Teil der Versuche wurde der Carotis-Sinus beiderseits denerviert, um Einflüsse des Sympathicus auf die Herzfrequenz bei Kreislaufregulationen möglichst auszuschalten. Es zeigte sich jedoch, daß hierdurch die Versuchsergebnisse nicht geändert wurden.

Die Injektionen von k-Strophanthin und Digitoxin erfolgten i. v. in etwa 5 min. Dosierung: k-Strophanthin[1] 20—30 γ/kg; Digitoxin[1] 60 γ/kg.

Befunde.

Das Verhalten von Blutdruck und Pulsfrequenz nach Strophanthin und Digitoxin unter den von uns gewählten experimentellen Bedingungen, insbesondere der kontinuierlichen Vagusreizung zeigen die Abb. 1 und 2. Beim Versuch der Abb. 1 wurden 30 γ/kg k-Strophanthin in 5 min intravenös injiziert. Während der Injektion und in der Folgezeit treten wesentliche Änderungen in Blutdruck und Pulsfrequenz nicht auf. Während der Injektion ist eher ein geringfügiger Anstieg der Frequenz zu beobachten, der nach Beendigung der Injektion wieder zurückgeht. Der Wert von 175 Pulsen/min wird im weiteren Verlauf des Experimentes nicht unterschritten. Die Beobachtungszeit nach Beendigung der Injektion beträgt in diesem Fall insgesamt 50 min. (Um den ganzen Verlauf registriertechnisch darstellen zu können, sind 9 Pausen von je 4 min in die Registrierung eingeschaltet.) Die Pulsfrequenz steigt während dieser Zeit etwas an, was auf die Verschiebung der „Grundfrequenz" (d. h. der Pulsfrequenz ohne Vagusreizung) zurückzuführen ist. Eine solche Erhöhung tritt im allgemeinen bei längeren Versuchszeiten ein. Nach Abschaltung der Vagusreizung stellt sich eine Frequenz von 230/min ein, gegenüber von 210/min vor der Vagusreizung[2].

Im Beispiel der Abb. 2 ist in gleicher Versuchsanordnung Digitoxin 60 γ/kg intravenös gegeben. Auch hier findet sich kein Anhaltspunkt für

[1] Wir benutzten „Kombetin"-Boehringer und Digitoxin „Merck". Den Herstellerfirmen danken wir für die Überlassung von Versuchsmengen.

[2] Es könnte sein, daß hierbei doch Änderungen der Narkosetiefe eine Rolle spielen.

eine Verstärkung der Vaguswirkung auf die Herzfrequenz. Im Verhalten des Blutdruckes hatten wir den Eindruck, daß nach Digitoxin stärkere und länger anhaltende Steigerungen als nach Strophanthin eintreten.

Weiteres experimentelles Material ist in der Tab. 1 zusammengestellt. Es sind hier die Werte für die Pulsfrequenz zu bestimmten Zeiten des Versuches während andauernder Vagusreizung angegeben.

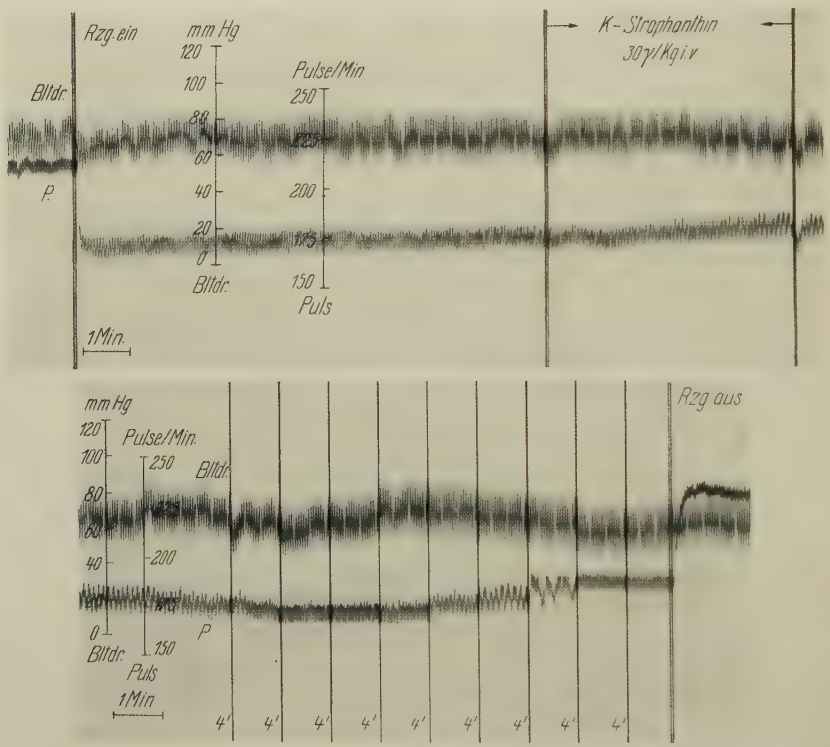


Abb. 1. Versuch vom 20. 1. 1953. Hund von 7,1 kg Gewicht. *Bltdr.* Blutdruck in der re. Art. femoralis; *P* fortlaufende Registrierung der Pulsfrequenz; Eichung in Pulsen/Minute. — Bei „*Rzg. ein*" Einschaltung der Reizung des re. peripheren Vagusstumpfes mit 0,5 Imp./sec, 15 mA Stromstärke und 0,3 msec Flußdauer. — Zwischen den beiden folgenden Signalen i. v. Injektion von k-Strophanthin 30 γ/kg. — Der untere Teil der Abbildung ist die direkte Fortsetzung des oberen. Es sind hier in die Registrierung Pausen von je 4 min eingeschaltet, um den ganzen Versuch registriertechnisch darstellen zu können. — Bei „*Rzg. aus*" Abschaltung der Vagusreizung.

(Vor Vagusreizung, 5 min nach Beginn der Vagusreizung, während der der Injektion von k-Strophanthin oder Digitoxin, 20 min und 40 min nach Beginn der Injektion und 3 min nach Beendigung der Vagusreizung.) In keinem der Versuche ist eine nennenswerte Verstärkung der Vaguswirkung zu beobachten. Im allgemeinen steigt die Pulsfrequenz

im Verlaufe des Versuches sogar etwas an. Im Versuch vom 23. 9. 1952 findet sich ausnahmsweise eine geringfügige Abnahme.

Auch wenn die Vagusreizung nur für kürzere Zeiten eingeschaltet wurde, war die Änderung der Pulsfrequenz vor und nach Gabe der

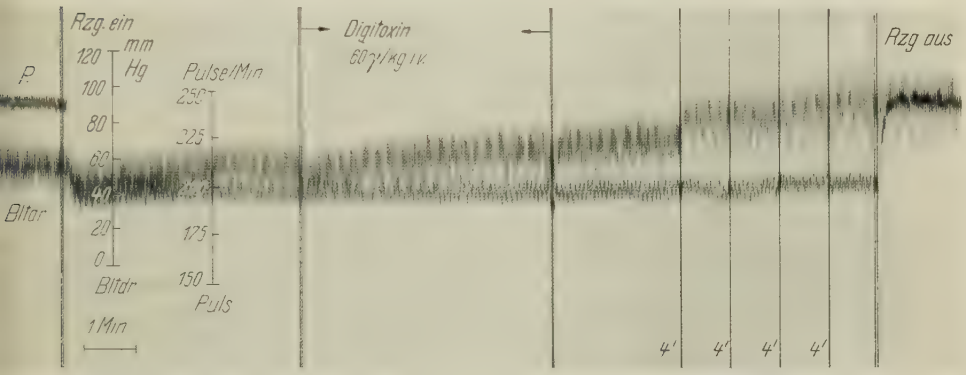


Abb. 2. Versuch vom 20. 1. 1953. Hund ven 7,1 kg Gewicht. *Bltdr.* Blutdruck in der re. Art. femoralis; *P* fortlaufende Registrierung der Pulsfrequenz; Eichung in Pulsen/Minute. — Bei „*Rzg. ein*" Einschaltung der Vagusreizung des re. peripheren Vagusstumpfes mit 0,5 Imp./sec, 15 mA Stromstärke und 0,3 msec Flußdauer. Zwischen den beiden folgenden Signalen i. v. Injektion von Digitoxin 60 γ/kg. — Im zweiten Teil der Abbildung Pausen von je 4 min in der Registrierung. Bei „*Rzg. aus*" Abschaltung der Vagusreizung.

Tabelle 1. *Strophanthin- u. Digitoxinwirkung auf Pulsfrequenz bei elektr. Vagusreizung.*

Versuch am				Pulse/Minute					
				vor Vagusreizg.	5' n. Beg. d. Vagusreizg.	während Injektion	20' nach d. Injektion	40' nach d. Injektion	3' n. Ende d. Vagusreizg.
11. 2. 1952	Hund	K-Stroph. 20 γ/kg		95	60	60	75	65	115
14. 2. 1952	Hund	K-Stroph. 20 γ/kg		220	140	140	140	135	228
22. 7. 1952	Hund	K-Stroph. 30 γ/kg		164	115	124	132	137	181
17. 9. 1952	Hund	K-Stroph. 30 γ/kg		182	132	155	153	—	185
22. 9. 1952	Hund	K-Stroph. 30 γ/kg		145	110	118	118	123	170
23. 9. 1952	Katze	K-Stroph. 30 γ/kg		143	115	110	110	110	140
9. 1. 1953	Hund	Digitoxin 60 γ/kg		250	200	205	215	225	270
21. 1. 1953	Katze	Digitoxin 60 γ/kg	Carotis-Sinus bdsts. denerv.	170	135	135	145	150	190

Digitalisglykoside gleich. Die Abb. 3 gibt hierfür ein Beispiel. Wie bereits in der Methodik erwähnt wurde, hat diese Versuchsanordnung den Vorteil, daß man Verschiebungen der Grundfrequenz (Herzfrequenz ohne Vagusreizung) besser erfassen kann.

Besprechung der Befunde.

Aus unseren Befunden ergibt sich, daß Digitalisglykoside die Vaguswirkung auf die Herzfrequenz nicht verstärken. Dieser Befund steht in Widerspruch zu Angaben der Literatur, namentlich zu den Befunden

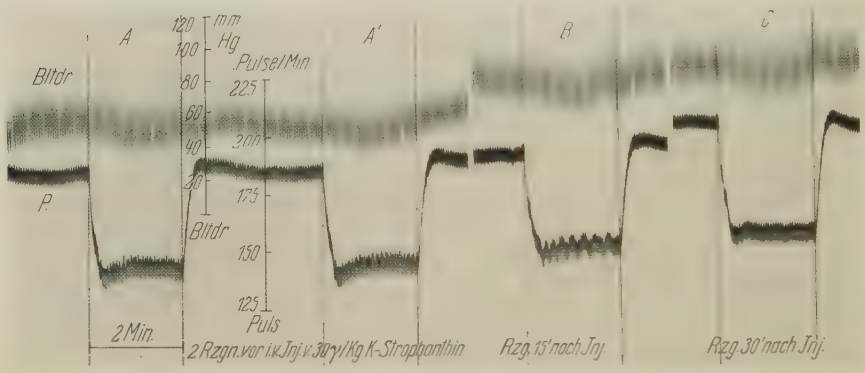


Abb. 3. Versuch vom 21. 1. 1953. Katze von 3,5 kg Gewicht. Vagusreizung für jeweils 2 min vor und nach Gabe von k-Strophantin. — *Bltdr.* Blutdruck in der re. Art. femoralis; *P.* fortlaufende Registrierung der Pulsfrequenz; Eichung in Pulsen/Minute. — *A* und *A'* Reizung des re. peripheren Vagusstumpfes für jeweils 2 min mit 1,0 Imp./sec, 15 mA Stromstärke und 0,3 msec Flußdauer vor Strophanthin; *B* gleiche Reizung 15 min nach i. v. Injektion von k-Strophanthin 30 γ-kg und *C* 30 min nach Injektion.

von Gremels, und es ergibt sich die Frage, welche Unterschiede in der Versuchsanordnung zur Erklärung der Differenzen herangezogen werden könnten.

Ein Punkt könnte unseres Erachtens die Art der elektrischen Reizung des Vagusstammes sein. Werden bei der Reizung hohe Reizimpulszahlen/sec und die sogenannte Schwellenstromstärken verwandt, so wird nur ein Teil der Vagusfasern, die Einfluß auf die Herzfrequenz haben, erregt. Es ist weiter als gesichert anzunehmen, daß die parasympathischen Fasern in Ganglien, die im Gebiet der Vorhöfe gelegen sind, umgeschaltet werden (Woollard; Lawrentjew; Kuntz). Damit werden aber die Zusammenhänge zwischen Erregungsfrequenz der präganglionären Fasern und der synaptischen Übertragung in Ganglien von Bedeutung. Sie wurden u. a. namentlich von Bronk; Rosenblueth und Folkow untersucht, Von den Befunden dieser Autoren ist für unsere Fragestellung wichtig, daß bei hochfrequenter Reizung Hemmungsvorgänge der synaptischen Erregungsübertragung nachweisbar sind. Bei längerer Reizdauer tritt zwar zunächst ein starker Reizerfolg

ein, da dieser selbstverständlich auch von der Zahl der Erregungen pro Sekunde abhängig ist. Doch erfolgt sehr bald eine Abnahme des Reizerfolges (Folkow). Diese Hemmungsvorgänge sind sicherlich an den Nervenendigungen im Erfolgsorgan, aber auch an ganglionären Schaltstellen zu lokalisieren. Konzett u. Rothlin haben nun den Befund mitgeteilt, daß am durchströmten Halsganglion Digitalisglykoside die Acetylcholinreaktion (Kontraktion der Nickhaut bei Injektion von Acetylcholin in die perfundierte Flüssigkeit) verstärken. Sie nehmen einen Angriff der Digitalisglykoside an den Ganglienzellen an. Es ist also nicht ausgeschlossen, daß die Erregungsübertragung in den parasympathischen Herzganglien durch Digitalis gefördert wird. Möglich wäre dieses gerade bei Reizung weniger präganglionärer Fasern durch Förderung der Erregungsausbreitung auf eine größere Zahl von Ganglienzellen im Ganglion oder durch Aufhebung der Hemmungsvorgänge, die bei frequenter Reizung im Ganglion auftreten, und die anscheinend auf dem Versagen einzelner Synapsen beruhen.

Wir haben versucht, experimentell diese mögliche Wirkung der Digitalisglykoside nachzuweisen, indem wir bei natürlicher Durchblutung des obersten Halsganglions die Glykoside intraartiell retrograd injizierten und die präganglionären Fasern mit verschiedenen Reizimpulsfolgefrequenzen erregten. Das Ausmaß der Nickhautkontraktion diente als Test. Wesentliche Förderungen der Nickhautkontraktion konnten wir bislang nicht beobachten, doch möchten wir die genannte Möglichkeit nicht ausschließen, bevor nicht auch das Verhalten der postganglionären Aktionspotentiale geprüft ist.

Überträgt man die obigen Überlegungen auf die parasympathischen Herzganglien, so erscheint es uns möglich, daß eine Förderung der synaptischen Erregungsübertragung in ihnen den Erfolg einer Vagusreizung verstärken kann. Ob dieses nun unter den experimentellen Bedingungen eintritt, wie sie von Gremels gewählt wurden (d. h. Erregung weniger präganglionärer Vagusfasern mit „Schwellenstromstärken“ und hohen Reizimpulsfolgefrequenzen), bedarf noch der Überprüfung.

Eine weitere Möglichkeit, die zu diskutieren ist, ist folgende: Bei Vagusreizung kann der Sinusknoten unter Umständen für die Reizbildung ganz ausfallen, die dann von heterotopen Zentren übernommen wird. Beim sogenannten „escape“ spielt dieser Vorgang eine Rolle. Nimmt man nun an, daß unter Einfluß von Digitalisglykosiden die tieferen Zentren schwerer einspringen, wenn der Sinusknoten ausfällt, so würde dieses ebenfalls zu einer stärkeren Vaguswirkung auf die Herzfrequenz führen. In unseren Versuchen haben wir diese Möglichkeit unseres Erachtens dadurch ausgeschaltet, daß wir niedere Reizimpulsfolgefrequenzen für die Vagusreizung benutzten, die nach unseren früheren Erfahrungen nicht zu einem vollständigen Ausfall des Sinusknotens führen, wie das gleichzeitig beobachtete EKG zeigte (Erdmann u. Mercker). Ob dieser Vorgang für die erwähnten andersartigen Befunde

über die Herzvaguswirkung nach Digitalisglykosiden eine Rolle spielt, müßte speziell mit gleichzeitiger EKG-Registrierung geprüft werden.

Bei der Übertragung experimenteller Befunde ist allgemein immer zu fragen, inwieweit die gewählte Versuchsanordnung sinnvoll mit den natürlichen Bedingungen vergleichbar ist. Im vorliegenden Fall interessiert die bei der Reizung angewandte Reizimpulsfolgefrequenz im Vergleich mit der bei natürlicher Innervation auftretenden Erregungsfrequenz vegetativer Fasern. Es ist anzunehmen, daß diese im Bereich von 1—10/sec liegt (vgl. Folkow). Bei höheren Reizimpulsfolgefrequenzen im Bereich von 30—60/sec treten offensichtlich Bedingungen in der synaptischen Erregungsübertragung ein, die von den natürlichen Verhältnissen abweichen. So sind beispielsweise Dauerkontraktionen der Nickhaut mit diesen Frequenzen nicht zu erzielen (Folkow). (Weitere Angaben über den Einfluß der Reizimpulsfolgefrequenz auf die Reaktion von vegetativ innervierten Organen finden sich bei Rosenblueth.)

Die von uns benutzten Reizimpulsfolgefrequenzen von 0,5—2/sec dürften niedriger sein als die bei natürlicher Innervation auftretenden, weil wir durch maximale Reizung alle Fasern, die für den Reizerfolg maßgebend sind, erregt haben.

Der Vorgang der natürlichen Innervation läßt sich experimentell nicht leicht nachahmen, weil die Abstufung der Reaktion des Erfolgsorganes durch gleichzeitige Änderung der Zahl der tätigen Nervenfasern und der Erregungsfrequenz der einzelnen Fasern erfolgt. Man könnte so vorgehen, daß man die maßgebenden Nervenfaserbündel aufsplittert und beispielsweise drei Anteile einzeln oder zusammen reizt, jeden Anteil für sich maximal. Bei geeigneter Anzahl von Nervenfasern in jedem Anteil würde man dann die Reizimpulsfolgefrequenz der natürlichen Erregungsfrequenz angleichen und auch den Vorgang einer Erregungsausbreitung in eingeschalteten Ganglien experimentell besser erfassen können. Die technischen Schwierigkeiten sind bei diesem Vorgehen jedoch nicht gering.

Der von Gremels gewählte Weg des Arbeitens mit „Schwellenstromstärken" oder etwas höheren Stromstärken erscheint uns nicht hinreichend frei von möglichen Störfaktoren. Bei der Einstellung von Schwellenstromstärken wird die Stromstärke so weit gesteigert, bis in dem Nervenstamm die entscheidenden Fasern erregt werden, aber keineswegs sämtliche die Reaktion des Erfolgsorganes — beispielsweise die Frequenz des Sinusknotens — beeinflussende Nervenfasern. Bei hohen Reizimpulsfolgefrequenzen wäre sonst die Reaktion viel zu stark, als daß noch eine Sensibilisierung beobachtet werden könnte. Durch Änderungen der Elektrodenlage oder durch verschiedene Nebenschlüsse für den Reizstrom treten bei Verwendung von Schwellenstromstärken und hohen Reizimpulszahlen sehr leicht verschiedene Anzahlen von Nervenfasern der betreffenden Nervenbündel in Aktion, wodurch wesentliche Änderungen im Reizerfolg auftreten können.

Zusammenfassung.

Die Frage einer Sensibilisierung der Vaguswirkung auf die Herzfrequenz durch Digitalisglykoside wurde geprüft.

Bei Hunden und Katzen in Narkose wurden Blutdruck und Pulsfrequenz fortlaufend registriert, bzw. die Pulsfrequenzwerte durch Zählen

ermittelt. In den Versuchen wurden die Vagi beiderseits durchtrennt und der rechte periphere Vagusstumpf gereizt. Die Reizung erfolgte mit Rechteckimpulsen niederer Reizimpulsfolgefrequenz (0,5—2/sec) und war für den einzelnen Impuls maximal.

Nach intravenöser Gabe von k-Strophanthin und Digitoxin fand sich kein Anhalt für eine sensibilisierende Wirkung dieser Digitalisglykoside auf die periphere Herzvaguswirkung, wobei als Test die unter Vagusreizung eintretende Pulsfrequenzsenkung diente.

Literatur.

Abdon, N. O., S. D. Hammarskjöld u. A. Nielsen: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **78**, 8 (1938). — Abdon, N. O., u. A. Nielsen: Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **78**, 1 (1938). — Bronk, D. W.: J. Neurophysiol., Springfield **2**, 380 (1939). — Erdmann, W. D., u. H. Mercker: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 563 (1952). — Folkow, B.: Acta Physiol. Skand. (Berl. u. Lpz.) **25**, 49 (1952). — Gremels, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **179**, 360 (1935). — Hampel, A.: Pflügers Arch. **244**, 171 (1941). — Heymans, C., J. J. Bouckaert et P. Régniers: C. r. Soc. Biol. Paris **110**, 572 (1932). — Heymans, J. F. and C. Heymans: J. of Pharmacol. **29**, 203 (1926). — Hohensee, F., u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 388 (1945). — Konzett, H., u. E. Rothlin: Helvet. physiol. Acta **8**, 64 (1950). — Kroebel, W.: Dtsch. med. Rdsch. **3**, Nr. 16 (1949). — Kuntz, A.: „The Autonomic Nervous System", Philadelphia 1947. — Lawrentjew, B. J.: Z. mikrosk.-anat. Forschg **16**, 383 (1929). — Lendle, L.: Hdb. exper. Pharmakol. Erg. Bd. I, 155 (1935). — N. med. Welt, Stuttgart: **1**, 75 (1950). — Lendle, L., u. H. Wienke: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 373 (1951). — Rosenblueth, A.: „The Transmission of Nerve Impulses at Neuroeffector Junctions and Peripheral Synapses", New York: Wiley and Sons, Inc. 1950. — Woollard, H. H.: Brit. J. Anat. **60**, 345 (1926). — Zinnitz, F.: Klin. Wschr. **29**, 630 (1951). — Ziff, H. F., u. H. Ehrlicher: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 529 (1951).

Prof. Dr. L. Lendle, Pharmakol. Inst. d. Univ. Göttingen, Geiststr. 9.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 362—365 (1953).

Aus dem Departamento de Farmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo — Brasilien.

Die digitalisartige Wirkung von Crinum pratense Herb. und Hippeastrum solandriflorum Herb.

Von

R. Wasicky*.

(Eingegangen am 27. Februar 1953.)

Die Analysen der beiden genannten Pflanzen wurden im Zuge einer systematischen Untersuchungsreihe von Pflanzen aus verschiedenen Pflanzenfamilien vorgenommen. Hierbei wurde von der Tatsache ausgegangen, daß Stoffe mit steroidartiger Grundstruktur in verschiedenen Familien weit verbreitet vorkommen und daß verschiedene von ihnen auch strukturellen Bedingungen entsprechen, die man den digitalisartig wirkenden Substanzen zuschreibt. Eine starke spezifische Digitaliswirkung bzw. eine genügende Konzentration der in Frage kommenden Substanzen wurde jedoch bisher nur in einer verhältnismäßig geringen Zahl von Pflanzen und Familien angetroffen, wie es etwa mit dem genus Digitalis aus der Familie der Scrophulariaceen oder Strophanthus aus der Familie der Apocynaceen der Fall ist. Doch hat die chemische Untersuchung, soweit sie vorgenommen wurde, gezeigt, daß neben den digitalisartigen Stoffen auch strukturell nahe verwandte ohne den Laktonring in der Seitenkette vorkommen, die als typische oder nicht typische Steroidsaponine anzusprechen sind. Nun haben die Untersuchungen verschiedener Forscher in den letzten Jahren bewiesen, daß der Kreis von Pflanzen mit digitaloiden Sterinen weiter zu ziehen ist als man bisher allgemein angenommen hat. Ich verweise in dieser Hinsicht auf die Untersuchungen von P. Karrer und anderen über die Digitaloide in *Corchorus* (Tiliaceen[2, 3, 4, 6]) und auf die Arbeiten über die Steroidsapogenine oder -saponine in *Dioscorea* (Dioscoraceen[7]). Mit Rücksicht auf das allgemeine Vorkommen von Sterinen in Pflanzen könnte man erwarten, daß es sich bei den veröffentlichten Fällen der Steroidderivate, die hierher fallen, nicht um Ausnahmsfälle handelt, sondern um mehr oder weniger zufällig erkannte Beispiele häufigerer Vorkommnisse. Systematische Forschungen in dieser Richtung fehlen nämlich. Schon

* Gewidmet Universitätsprofessor Dr. Otto Loewi anläßlich seines 80. Geburtstages.

die ersten Untersuchungen dieser Art, die von mir und meinen Mitarbeitern mit brasilianischen Pflanzen vorgenommen wurden, zeigen die Berechtigung derartiger Vermutungen; denn wir fanden in verschiedenen Arten von Liliaceen, Amaryllidaceen, Discoreaceen, Asclepiadaceen und anderen Familien digitalisartige Wirkungen. Weniges davon wurde bereits der Veröffentlichung zugeführt, so über die digitaloide Wirkung von *Crinum amabile* Donn[9].

Derartige Untersuchungen erscheinen mir in doppelter Hinsicht von Bedeutung. Einmal erweitern sie die Möglichkeit der Auffindung von neuen Digitaloiden, sodann dürften sie dazu beitragen in den Sterin-Metabolismus der Pflanzen einen besseren Einblick zu gewinnen.

Crinum pratense und *Hippeastrum solandriflorum* gehören der Familie der Amaryllidaceen an, von denen digitalisartige Wirkungen meines Wissens nicht berichtet wurden. Die erste der beiden Pflanzen fand ich in einem Garten in der Nähe von São Paulo, die zweite in einem Walde des Grenzgebietes der Staaten Rio de Janeiro und São Paulo. Beide sind Pflanzen mit starken Zwiebeln. Die Untersuchung erstreckte sich auf die grünen Blätter, auf die fleischigen Zwiebelschalen, die Wurzelstöcke und die Wurzeln der Pflanzen. Der Untersuchungsgang nahm den bitteren Geschmack, die Brechwirkung an Tauben nach intravenöser Einverleibung, die Wirkung auf das Herz von Meerschweinchen nach dem Eichungsverfahren von Knaffl-Lenz[5] (vgl. auch J. H. Burn)[1], in Betracht. Immer wurden Vergleiche mit Standard-Digitalis (USA) angestellt. Nur wurden für diese letzteren Bestimmungen (d. h. an *Crinum* und *Hippeastrum*) die alkoholischen Extraktrückstände mit physiologischer Kochsalzlösung in der Weise extrahiert, daß (berechnet auf Trockensubstanz) 20%ige Lösungen intravenös infundiert wurden.

Was die Bitterwertbestimmung anbelangt, so wurde sie deswegen vorgenommen, weil ich in meinen Untersuchungen über Digitalis und Digitaloide ohne Ausnahme fand, daß sie einen starken bitteren Geschmack aufweisen. Pflanzen mit bitteren Stoffen können natürlich ihren Geschmack auch ganz anders konstituierten Substanzen verdanken. Der Bittergeschmack einer Pflanze besagt nur, daß Pflanzen mit digitalisartiger Wirkung vorliegen *können*, die weiter untersucht werden müssen. Bei Abwesenheit von bitterem Geschmack untersuchte ich die Pflanzen nicht weiter auf Herzwirkung. Das von mir befolgte Verfahren war in seinen Grundzügen mit dem von mir vor Jahren veröffentlichten Eichungsverfahren für Bitterdrogen identisch[8]. Nachdem sich gezeigt hatte, daß die bitteren Stoffe von Crinum und Hippeastrum gut in Wasser und in Alkohol löslich sind, fertigte ich konzentrierte alkoholische Extrakte der Frischpflanzen oder der bei 100° getrockneten Organe an. Der Alkohol wurde abgedampft, sodann verschiedene Verdünnungen des Extraktes in Wasser angefertigt. In gleicher Weise wurde der Vergleich mit geeichten Digitalisblättern durchgeführt. Die Eichung der die Prüfung anstellenden Personen wurde mit kristallisiertem Bruzin $C_{23}H_{26}N_2O_4 \cdot 4\,H_2O$ vorgenommen.

In Brasilien empfinden ungefähr 60% der Personen die Brucinlösung in der Verdünnung 1:5500000,00 noch bitter. Es wurde mit den größten Verdünnungen begonnen und hernach der Mund mit Wasser gründlich ausgespült. Nach 15 min

erfolgte die Prüfung der nächst höheren Konzentration (5 cm³). Alle Bitterwerte wurden auf den oben angegebenen Brucin-„Normal"-Wert berechnet und auf Trockensubstanz der Droge, wie es auch bei den anderen Prüfungen geschah.

Im folgenden sind die mit den einzelnen Organen erhaltenen Resultate angeführt, gleichzeitig auch zum Vergleich die entsprechenden Werte für Digitalis.

Crinum pratense.

Bitterwerte

für die Blätter 1:120	Für Digitalis-Standard-Blätter 1:6000
„ „ Zwiebeln 1:1500	
„ „ Wurzelstöcke 1:180	
„ „ Wurzeln 1:600	

Brechwerte an Tauben (pro kg)

für die Blätter noch große Dosen ohne Wirkung	
„ „ Zwiebeln 0,17 g	Für Digitalis-Standard-Blätter 0,02 g pro kg
„ „ Wurzelstöcke 0,5 g	
„ „ Wurzeln 0,4 g	

Meerschweinchenwerte (pro kg)

für die Blätter fast ohne Wirkung	
„ „ Zwiebeln 1,37 g	Für Digitalis-Standard-Blätter 0,155 g pro kg
„ „ Wurzelstöcke 5,5 g	
„ „ Wurzeln 4,0 g	

Hippeastrum solandriflorum.

Bitterwerte

für die Blätter 1:100	
„ „ Zwiebeln 1:1200	Für Digitalis-Standard-Blätter 1:6000
„ „ Wurzelstöcke 1:130	
„ „ Wurzeln 1:450	

Brechwerte an Tauben (pro kg)

für die Blätter nicht feststellbar	
„ „ Zwiebeln 0,3 g	Für Digitalis-Standard-Blätter 0,02 g pro kg
„ „ Wurzelstöcke 0,6 g	
„ „ Wurzeln 0,5 g	

Meerschweinchenwerte (pro kg)

für die Blätter nicht feststellbar	
„ „ Zwiebeln 2,1 g	Für Digitalis-Standard-Blätter 0,153 g pro kg
„ „ Wurzelstöcke nicht feststellbar	
„ „ Wurzeln 5 g	

Wie aus den angeführten Ergebnissen ersichtlich ist, weisen beide untersuchten Arten zweifellos eine digitalisartige, allerdings quantitativ sehr schwache Wirkung auf, im Vergleich mit Standardblättern der Digitalis purpurea. Unter diesen Umständen wurde darauf verzichtet, eine Isolierung der in Frage kommenden Stoffe zu versuchen. Vielmehr werden

sich weitere Versuche mit anderen *Hippeastrum* und *Crinum*-Arten beschäftigen, die sich in Brasilien in größerer Zahl vorfinden, von denen einige als giftig bekannt sind, wie z. B. *Hippeastrum equestre* Herb., und auch in der brasilianischen Volksmedizin Verwendung finden, z. B. die Zwiebeln von *Crinum scabrum* Sims, als kräftiges Diureticum.

Literatur.

[1] Burn, J. H.: Biological Standardization. 2nd. ed. **1950**, 1953–59. — [2] Chaudhury, D. N., and Chandra Paresh Dutta: Chem. Abstr. **45**, 9101 (1951). — [3] Gabra Soliman and Wahba Salch: J. Chem. Soc. Lond. **1950**, 2198. — [4] Karrer, J., u. P. Banerjea: Helvet. chim. Acta **32**, 2385 (1949). — [5] Knaffl-Lenz, E.: J. of Pharmacol. **29**, 407 (1926). — [6] Kumar Sen Nirwal and Nagendra Nath Das: Chem. Abstr. **44**, 9058 (1950). — [7] Marker, E. Russell: J. Amer. Chem. Soc. **71**, 3856 (1949); **71**, 4149 (1949). — [8] Wasicky, R.: Bull. Féd. Internat. Pharmaceut., Amsterdam 1928. — [9] Wasicky, R., and K. Hardebeck: Anais da Faculdade de Farm. e Odontol. de São Paulo **10** (im Druck).

Prof. Dr. Richard Wasicky, Rua Maranhão 600, São Paulo, Brasil.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 366—370 (1953).

Institut Léon Fredericq, Physiologie et Laboratoire de Pathologie générale de l'Université de Liège.

Action de la cystéamine sur le coeur isolé de grenouille et sur l'effet de l'excitation vagale chez la tortue*.

Par

D. Della Bella** et Z. M. Bacq***.

Avec 4 figures.

(Eingegangen am 28. Februar 1953.)

I.-Introduction:

La cystéamine, $HS\text{-}CH^2\text{-}CH^2\text{-}NH^2$ (ou mercaptoéthylamine ou Bécaptan Labaz[+]) a été surtout étudiée en relation avec l'action des radiations ionisantes chez l'animal et le mal des rayons chez l'homme[1, 2, 3, 4]. Au cours d'une étude systématique des propriétés pharmacodynamiques de cette amine, nous avons observé que *in vitro*, la cystéamine à forte concentration désensibilise le rectus de grenouille à l'acétylcholine. Le but ce travail a donc été de rechercher si la cystéamine modifie l'action de l'excitation vagale sur le coeur de Tortue; quelques essais furent aussi faits sur le coeur de grenouille.

II.-Techniques:

Le coeur de la tortue *(Testudo graeca)* est découvert après destruction du système nerveux central, le nerf pneumogastrique gauche est disséqué au cou, le bout périphérique est stimulé par des décharges de condensateurs rythmées à 200 par minute (les stimuli sont maximaux), les contractions de l'oreillette droite *in situ* sont enregistrées par un levier isotonique. Toute la technique a été minutieusement décrite et justifiée par H. Fredericq[++] qui l'a utilisée dans de nombreux travaux[8, 9] notamment). Le péricarde est soigneusement conservé et constitue une cuvette dans laquelle on peut verser un liquide de composition connue (normalement, la solution saline classique de Ringer) et ainsi faire agir *localement* la substance qu'on étudie.

Nous avons aussi utilisé la technique de H. Fredericq[10] pour stimuler les fibres postganglionnaires vagales en excitant directement l'oreillette droite au moyen de stimuli électriques dont la fréquence est légèrement plus grande que celle des contractions spontanées.

---

* Dédié au professeur Otto Loewi à l'occasion de son quatrevingtième Anniversaire.

** Boursier des Accords culturels italo-belges.

*** Ce travail est respectueusement dédié à Otto Loewi en souvenir de son séjour en Belgique en 1939.

[+] Gracieusement fournie par le Service des Recherches de la Société des Laboratoires Labaz, Bruxelles.

[++] Nous remercions le Prof. H. Fredericq qui nous a montré ses techniques et chez qui ce travail a été effectué.

Le coeur de grenouille *(Rana temporaria)* a été isolé selon STRAUB. Les concentrations de cystéamine sont toujours exprimées en base; en effet, pour obtenir un p_H voisin de 7, on est obligé de neutraliser (par HCl) partiellement l'amine, le chlorhydrate est trop acide pour l'usage biologique.

III.-Résultats:

a) Coeur isolé de grenouille: La toxicité de la cystéamine est faible. Des concentrations (en base) de $4 \cdot 10^{-5}$ à $1 \cdot 10^{-3}$ provoquent assez régulièrement une augmentation de l'amplitude des contractions; il faut arriver à une concentration de $2 \cdot 10^{-3}$ pour voir apparaître les premiers effets néfastes; encore faut-il que la solution reste au contact du coeur pendant plusieurs minutes et qu'elle soit éventuellement remplacée par

Fig. 1. Coeur de grenouille isolé selon STRAUB. Temps en minutes. Les flèches du haut indiquent les lavages au RINGER. *1* Acétylcholine, concentration finale $1 \cdot 10^{-7}$. *2* Cystéamine 0.1%. *3* Sans lavage, addition d'acétylcholine pour faire $1 \cdot 10^{-7}$. *4* Après lavages, acétylcholine $1 \cdot 10^{-7}$. Inhibition partielle des effets de l'acétylcholine par la cystéamine, persistant cinq minutes après lavages.

une solution fraîche de même concentration. Réduction progressive de l'amplitude des contractions puis arrêt diastolique, tels sont les effets toxiques qui, une fois obtenus, ne sont pas réversibles après lavages multiples de la préparation. L'action de l'acétylcholine sur le coeur isolé est antagonisée par un traitement préventif à la cystéamine. Si la concentration en acétylcholine est faible (diminution de 50% environ de l'amplitude des contractions) une concentration de 2.10^{-5} en cystéamine suffit pour l'antagoniser; mais si la concentration d'acétylcholine est telle qu'elle arrête le coeur, il faut au moins 1.10^{-3} de cystéamine, et l'antagonisme n'est pas parfait (fig. 1). Il suffit d'une minute de contact avec la cystéamine pour que l'action atropinique se manifeste; elle persiste dix à vingt minutes après enlèvement de la cystéamine (fig. 1) mais est parfaitement réversible après lavages répétés.

b) Coeur de Tortue: Il faut atteindre une concentration de 0.1% en cystéamine base pour diminuer l'effet de l'excitation vagale sur l'oreillette *in situ* de la tortue, et il faut que le coeur ait baigné dans la cystéamine pendant 5 à 20 minutes. Quand on enlève la solution de cystéamine, l'effet atropinique persiste pendant 20 à 30 minutes, puis disparait

progressivement après lavages répétés. On peut ainsi démontrer plusieurs fois sur la même préparation l'effet atropinique de la cystéamine (fig. 2).

L'action de la cystéamine est bien du type atropinique; elle porte sur les terminaisons postganglionnaires du vague; il ne s'agit pas d'un

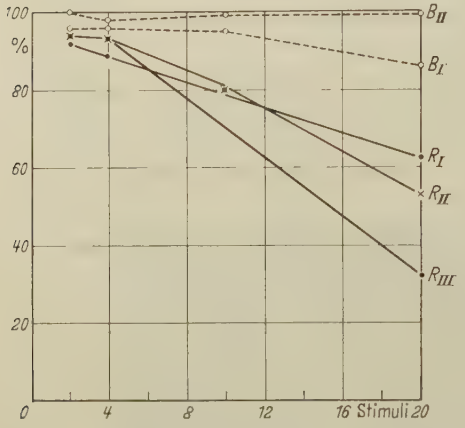


Fig. 2. *En ordonnées*, amplitude de la contraction de l'oreillette droite de *Testudo graeca*, en pour cent de l'amplitude normale (= 100). *En abscisses*, nombre des stimuli maximaux sur le nerf pneumogastrique gauche.

R_I: premières observations en Ringer, effets normaux de l'excitation vagale, réduction de l'amplitude des contractions, proportionnelle aux nombres d'influx.

B_I: 5 minutes après passage en sol. 0.1% de cystéamine; diminution des effets de l'excitation vagale.

R_{II}: après lavages multiples au Ringer, retour aux effets normaux de l'excitation vagale.

B_{II}: 5 minutes après nouvelle immersion dans la cystéamine 0.1%, abolition des effets de l'excitation vagale.

R_{III}: après lavages multiples, réapparition de la réponse à l'excitation vagale.

blocage au niveau des synapses ganglionnaires intracardiaques. En effet, la cystéamine réduit l'effet vagal de la stimulation *directe* de l'oreillette (fig. 3); toutefois cette action est, en général, moins rapide et plus faible que la diminution des effets de l'excitation préganglionnaire. Il n'est donc pas exclu que la cystéamine puisse agir sur les synapses ganglion-

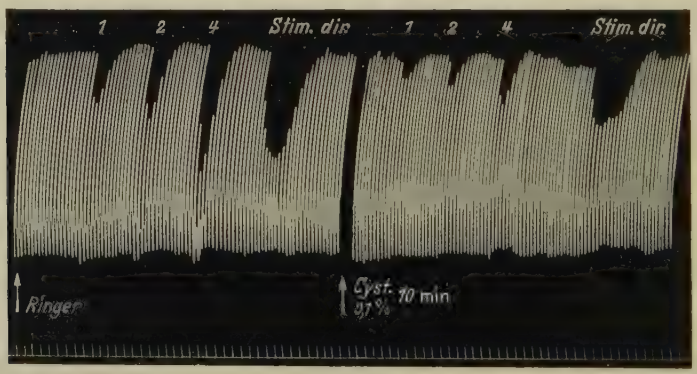


Fig. 3. Oreillette droite de Tortue. *En* Ringer *normal;* effets de *1*, *2*, et *4* stimuli maximaux sur le vague gauche; action de l'excitation directe de l'oreillette. Dix minutes après passage en *cystéamine 0.1%*, effets très réduits de *1*, *2* et *4* stimuli; effet relativement moins diminué, de l'excitation directe de l'oreillette.

naires; cette idée est d'autant plus vraisemblable que nous avons observé chez le chat, avec M. Goffart un effet typiquement curarisant de la cystéamine injectée à haute dose par voie intraartérielle[7].

De plus, le blocage de la conduction nerveuse des fibres cholinergiques pré- et postganglionnaires, n'est pas exclu. Si on met sur le vague cervical lui-même (en aval des électrodes) un tampon imbibé de cystéamine 1% et qu'on renouvelle ce tampon toutes les 5 minutes*, on n'observe après une heure aucune modification des effets de l'excitation, donc aucun arrêt de la conduction; mais si le tampon porte une solution à 2%, le blocage de la conduction est complet en 20 à 30 minutes (fig. 4).

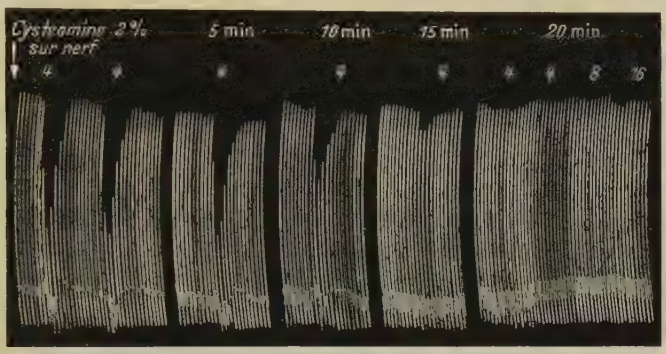


Fig. 4. Oreillette droite de Tortue; RINGER normal. Au début du tracé, à l'endroit marqué d'une flèche, on dépose un tampon imbibé de cystéamine 2% *sur le nerf vague lui-même*, entre les électrodes et le coeur. Disparition progressive, en 20 minutes, de tout effet de l'excitation, blocage de la conduction.

Cet effet, que l'on observe aussi très bien sur la préparation nerf sciatique-gastrocnémien de grenouille est lentement réversible; il faut 40 à 50 minutes de lavages fréquents au RINGER pour que la conduction nerveuse soit rétablie.

IV. - Discussion.

Il semble bien établi par ces expériences que la cystéamine est peu toxique pour le coeur de grenouille et de tortue et qu'elle possède à concentration maintenue relativement forte une action atropinique. Cette action ne s'observe pas chez le Lapin auquel on injecte des quantités même considérables (200 mg) de cette amine, parce que la concentration réalisée dans le sang et les tissus baisse rapidement; la molécule est très vite excrétée et métabolisée, on n'arrive pas à réaliser *in vivo* une concentration suffisante pendant le temps nécessaire pour que l'action atropinique se manifeste.

A ces concentration élevées (0.1% et plus), la cystéamine comme tous les porteurs de fonctions sulfhydryles inhibe les enzymes dont le

* La cystéamine à l'air s'oxyde assez rapidement en son disulfure, la cystinamine $S—CH^2—CH^2—NH^2$
$S—CH^2—CH^2—NH^2$.

métal actif est le cuivre; nous avons très bien vu ce fait, simplement en observant le rougissement d'une solution de catéchol 1% à température ordinaire en présence d'une goutte d'extrait de champignon de couche. Il est aussi logique de penser qu'à ces concentrations élevées, les enzymes dont le fer est le métal actif (hydropéroxydases) et les cytochromes doivent être bloqués. Le blocage de la conduction dans le nerf par la cystéamine à 2% est vraisemblablement dû à ces inhibitions; le cyanure a la même action; le disulfure (cystinamine) qui ne combine plus les métaux, n'arrête pas la conduction dans le nerf, même à 2% après 30 à 40 minutes d'application locale.

Il est plus difficile de savoir si l'effet atropinique lui aussi a pour cause la même inhibition enzymatique. On n'a pas signalé une action atropinique du cyanure, peut-être parce qu'on ne l'a pas cherchée. Malheureusement, la cystinamine ne peut plus servir de contrôle; en effet, elle se réduit aisément en cystéamine au contact des tissus et de la cystéine[5,6] et elle libère de l'histamine[11]. De toute façon, il est certain qu'aux doses (200 à 500 mg) où la cystéamine est utilisée chez l'homme, aucune action atropinique ne peut être observée.

Conclusions.

1. La cystéamine (β-mercaptoéthylamine ou Bécaptan Labaz) n'est toxique pour le coeur de grenouille ou de tortue qu'à partir de la concentration élevée de 0.2%.

2. La cystéamine ($1 \cdot 10^{-4}$ à $1 \cdot 10^{-3}$) diminue l'action de l'acétylcholine sur le coeur de grenouille ainsi que les effets de l'excitation vagale sur l'oreillette de tortue.

3. A très forte concentration (2%), elle bloque la conduction dans les fibres nerveuses.

Bibliographie.

[1] Bacq, Z. M., A. Herve, J. Lecomte, P. Fischer, J. Blavier, G. Dechamps, H. Le Bihan et P. Rayet: Arch. internat. Physiol. **59**, 442 (1951). — [2] Bacq, Z. M., et A. Herve: Bull. Acad. Méd. Belg., VIème Série, t. XVIII, p. 13 à 58 (1952). — [3] Bacq, Z. M., et A. Herve: J. suisse méd. **82**, 160 (1952); n° spécial à l'occasion du 60ème anniversaire du Prof. A. Fleisch. — [4] Bacq, Z. M., A. Herve, P. Fischer, J. Lecomte, M. Pirotte, G. Dechamps, H. Le Bihan et P. Rayet: Rev. méd. Liège **8**, 104 (1953). — [5] Bacq, Z. M., P. Fischer et M. Pirotte: Arch. internat. Physiol. **60**, 535 (1952). — [6] Bacq, Z. M., P. Fischer et M. Pirotte: Arch. internat. Physiol. **60**, 559 (1952). — [7] Della Bella, D., et M. Goffart: Observations inédites. — [8] Fredericq, H.: Arch. internat. Physiol. **40**. 227 (1934). — Fredericq, H.: Arch. internat. Physiol. **46**, 195 (1938). — [10] Fredericq, H.: Arch. internat. Physiol. **43**, 212 (1936). — [11] Lecomte, J.: Arch. internat. Physiol. **60**, 179 (1952).

Professor Z. M. Bacq Laboratoire de Pathologie et thérapeutique Générales, 1, rue des Bonnes Villes, Liège/Belgien.

Arch. exper. Path. u Pharmakol., Bd. 219, S. 371—385 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Harvard Medical School,
Boston, Massachusetts/U. S. A.

Untersuchungen über die Veratrumalkaloide.

XVIII. Die chemischen und pharmakologischen Beziehungen zwischen den Zygadenusalkaloiden und den Veratrumalkaloiden* **.

Von

OTTO KRAYER, S. M. KUPCHAN, C. V. DELIWALA und B. H. ROGERS.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. März 1953.)

1. Historische Vorbemerkungen über die Zygadenus-Arten und ihre wirksamen Prinzipien.

Verschiedene Arten der Gattung Zygadenus der Liliazeen sind seit langer Zeit in den Vereinigten Staaten von Amerika als Ursache der Vergiftung von Weidetieren bekannt. Es handelt sich in der Hauptsache um vier Arten, von welchen drei — Zygadenus gramineus, Zygadenus venenosus und Zygadenus paniculatus — im Westen vorkommen, während die vierte, Zygadenus Nuttallii im Mittelwesten heimisch ist. Es ist sehr wahrscheinlich, daß andere Arten ähnliche giftige Eigenschaften besitzen; jedoch spielen sie unter den üblichen Weidebedingungen keine Rolle, wie dies von Zygadenus elegans bekannt ist. (MARSH, CLAWSON und MARSH, 1915; MARSH und CLAWSON, 1924; MARSH und CLAWSON 1922, revidiert 1929; MARSH, CLAWSON und ROE, 1926.)

Die drei genannten westlichen Zygadenus-Arten sind besonders gefährlich für Schafe; Vergiftungen von Rindern und Pferden sind leichter und weniger häufig. Zygadenus Nuttallii verursacht besonders bei Rindern viele schwere und tödliche Vergiftungen. Beim Menschen kommen gelegentlich Vergiftungen vor, wenn die Zwiebeln mit denen der eßbaren Sego, einer Calochortus-Art, verwechselt werden (MARSH, CLAWSON und MARSH 1915); oder wenn die Kinder die Zwiebeln oder andere Teile der Pflanzen essen, wie in dem kürzlich von CAMERON (1952) beschriebenen Falle.

Über die frühesten chemischen und pharmakologischen Versuche über Zygadenus hat HUNT 1915 im U. S. Department of Agriculture Bulletin No. 125 (vgl. MARSH, CLAWSON und MARSH, 1915) berichtet. Danach gelang es COLLIER (1882) zum ersten Male, Alkaloidreaktionen mit Extrakten aus Zwiebeln von Zygadenus paniculatus nachzuweisen. HUNT selbst versuchte 1901 die aktiven Prinzipien von Zygadenus zu isolieren und ihre chemischen und pharmakologischen Eigenschaften zu bestimmen. Zu diesem Zwecke bereitete er alkoholische Extrakte aus den Blättern und Blütenständen von Zygadenus venenosus. Nach weiterer Reinigung erhielt er Rohalkaloide, deren chemische Reaktionen denjenigen von Veratrin ähnlich waren. HUNTS Befunde wurden von SLADE (1905) und von HEYL, HEPNER und LOY (1913) bestätigt. Es gelang weder HUNT noch SLADE oder VEJUX-TYRODE

* Herrn Professor Dr. OTTO LOEWI zum achtzigsten Geburtstage gewidmet.

** Die Kosten dieser Versuche wurden aus Beiträgen des United States Public Health Service und des Eugene Higgins Trust der Harvard Universität bestritten.

(1904) Reinsubstanzen aus den Alkaloidgemischen von Zygadenus zu isolieren. Heyl, Hepner und Loy erhielten ein kristallisiertes Alkaloid, das sie als Zygadenin bezeichneten. Im Jahre 1944 isolierte Varlakov aus Zygadenus sibiricus zwei amorphe Alkaloide, welche chemisch dem Veratrin ähnlich waren.

Im Zusammenhang mit den chemischen Untersuchungen von Poethke, Jacobs und Craig und anderen über die Chemie der Veratrumalkaloide (Lit. siehe Krayer und Acheson 1946) führten Heyl und Herr (1949) weitere Versuche mit Zygadenin aus. Nach diesen Untersuchungen ist das Zygadenin ein tertiäres Alkamin mit der empirischen Formel $C_{27}H_{43}O_7N$ und ist der tertiären Base Cevin aus Veratrin, dem Alkaloidgemisch der Sabadillsamen, ähnlich.

Die pharmakologische Verwandtschaft zwischen den Zygadenusalkaloiden und den Veratrumalkaloiden wurde schon von Hunt (1902) klar erkannt. Er beobachtete nicht nur die charakteristische Veratrinkontraktion am Skeletmuskel des Frosches, sondern auch die den Veratrinwirkungen ähnlichen Veränderungen der Atmung und des Kreislaufes bei Säugetieren. Nach den Angaben von Marsh, Clawson und Marsh (1915) hat Sollmann (1903) die Versuche Hunts nachgeprüft und bestätigt. Als Mitchell und Smith (1911) das Zygadenin untersuchten, waren sie überrascht von der geringen pharmakologischen Wirksamkeit. Offenbar konnte dieses Reinalkaloid nicht für die Wirksamkeit der unreinen Alkaloidgemische verantwortlich gemacht werden. Versuche am Frosch führten Varlakow zu dem Schluß, daß seine beiden aus Zygadenus sibiricus isolierten amorphen Alkaloide als Ersatz für eingeführtes Veratrin dienen könnten.

Dieser kurze geschichtliche Abriß kennzeichnet den Stand unserer Kenntnis zur Zeit des Beginns unserer eigenen Untersuchungen über die Chemie und Pharmakologie der Zygadenusalkaloide im Jahre 1949. Es wurde beschlossen, zwei pharmakologische Methoden zur Untersuchung des Verbleibes der Wirksamkeit bei der chemischen Aufarbeit zu benutzen, die Veratrinkontraktion des isolierten M. sartorius des Frosches und die Atmungs- und Kreislaufwirkung bei der narkotisierten Katze. Die Brauchbarkeit dieser Methoden wurde unverzüglich durch den Erfolg der chemischen Trennungs- und Reinigungsmethoden bestätigt. Es konnte leicht nachgewiesen werden, daß die Rohextrakte aus Zygadenus venenosus und Zygadenus paniculatus mit großer Wahrscheinlichkeit Esteralkaloide enthielten, ähnlich den Estern der tertiären Alkamine der Veratrumarten.

Die chemische Arbeit der Isolierung, Reinigung und Identifizierung der Reinsubstanzen wurde ganz erheblich durch die pharmazeutischen Werke Eli Lilly und Company, Indianapolis, Indiana, U.S.A. gefördert, welche bereitwilligst große Mengen von Zygadenus venenosus zu unserer Verfügung stellten und Rohextrakte der Alkaloide für uns bereiteten. Für die botanische Identifizierung der von uns benutzten Zygadenusarten sind wir Herrn Professor R. Rollins vom GRAY-Herbarium der Harvard Universität zu Dank verpflichtet.

2. Chemie. Methoden und Ergebnisse.

Heyl, Hepner und Loy (1913) und Heyl und Herr (1949) benutzten Alkohol zur Extraktion des gepulverten Materials aus Zygadenus venenosus. Um mögliche Verluste an Wirksamkeit durch Alkolyse zu vermeiden (Fried u. Mitarb. 1950 und 1952) wurde statt dessen Chloroform

als ursprüngliches Auszugsmittel angewandt. Die Ausbeute an Rohalkaloid durch Chloroformextraktion betrug 0,28% des Gewichtes der getrockneten Teile der Gesamtpflanze. Die nachfolgenden Alkoholextraktion ergab weitere 0,22%. Die Gesamtausbeute entsprach demnach der von Heyl und Herr (0,49%) erhaltenen.

Das basische Material des Chloroformextraktes wurde einer 8stufigen Gegenstromverteilung nach Craig (1949) bei p_H 5,5 unterworfen. Als Lösungsmittel dienten Benzol und 2-molare Acetatpufferlösung. Die alkaloiden Substanzen verteilten sich ziemlich gleichmäßig über die 8 Stufen. Die pharmakologische Untersuchung ergab dagegen eine Konzentration des größten Teiles der blutdrucksenkenden Wirksamkeit in den Alkaloiden der Stufen 5—8.

Um das aktive Material in einer einzigen Fraktion zu konzentrieren, wurde die 8stufige Verteilungsmethode modifiziert. Benzol und Phosphatpufferlösung bei p_H 7,1 führten zum Ziel. Es gelang 25—30% der Gesamtmenge der Alkaloide und den größten Teil der blutdrucksenkenden Wirksamkeit in der Fraktion der 8. Stufe anzureichern. Die übrigen Alkaloide wurden in zwei Fraktionen geteilt; die eine enthielt die Alkaloide der Stufen 1—7, die andere die Alkaloide der Stufe 0. Aus der Lösung der Rohalkaloide der 8. Stufe in Aceton kristallisierte ein reines Alkaloid aus. Alkalische Hydrolyse mit Natrium in Äthylalkohol ergab Veratrinsäure und ein neues Alkamin, das sich als ein Isomeres des Zygadenins erwies und Pseudozygadenin genannt wurde. Diese Base konnte aus Zygadenin durch entsprechende alkalische Behandlung erhalten werden. Diese und andere Befunde machen es sehr wahrscheinlich, daß das Alkaloid ein Veratrinsäureester des Zygadenins ist. Es erhielt deshalb die Bezeichnung Veratrylzygadenin, obgleich es bisher nicht gelang, unsere Annahme durch Hydrolyse einwandfrei zu bestätigen.

Nach Beseitigung des Veratrylzygadenins durch Filtrieren wurde das Filtrat der Fraktion der 8. Stufe lyphilisiert, der Rückstand in Chloroform aufgenommen und an mit Schwefelsäure gewaschenem Aluminiumoxyd chromatographiert. Aus der Acetonlösung der Fraktion, welche am schwierigsten zu eluieren war, kristallierte ein neues Alkaloid aus. Die alkalische Hydrolyse ergab Vanillinsäure und Pseudozygadenin. Die Einführung einer Methylgruppe mit Hilfe von Diazomethan führte die Substanz in Veratrylzygadenin über. Das Alkaloid erhielt deshalb den Namen Vanillylzygadenin.

Chloroformextraktion der alkalisch gemachten Fraktion der Stufe 0 lieferte einen amorphen Alkaloidrückstand, der trotz aller Mühe nicht kristallisiert werden konnte. Wenn die alkalische Lösung jedoch zuerst mit Benzol extrahiert wurde, konnten mit der nachfolgenden Chloroformextraktion drei kristallisierte Substanzen aus der Alkaloidmischung

erhalten werden. Kristallisation mit Aceton ergab Zygadenin und Protoveratridin. Lyophilisierung des Acetonfiltrates lieferte einen festen Rückstand, der nach Aufnahme mit Chloroform kristallisierte und sich als Germin erwies (Kupchan u. Deliwala 1952a).

Bei dem soeben beschriebenen Arbeitsgang blieb der größte Teil des Alkaloidmaterials in den amorphen Rückständen. Um diese komplizierten Mischungen zu trennen, mußten deshalb weitere Methoden der Aufarbeitung geprüft und angewandt werden. Bei einer detaillierten 8stufigen Gegenstromverteilung mit Benzol und Phosphatpuffer bei p_H 7,1 verteilten sich die Alkaloide ziemlich gleichmäßig über die verschiedenen Stufen. Die Untersuchung der Infrarotspektren der einzelnen Teilfraktionen ergab jedoch eine große Ähnlichkeit der Spektren der basischen Substanzen der Stufen 4—8 einerseits und der Spektren der Fraktionen der Stufen 0—3 andererseits. Die Teilfraktionen der Stufen 4 bis 8, respektive der Stufen 0—3, wurden deshalb vereinigt. Wir bezeichneten die erstere als „organophile" Fraktion, die letztere als „hydrophile Fraktion". In der Folge wurden diese beiden Fraktionen durch ein einfaches Verteilungsschema hergestellt. Zu diesem Zwecke genügten 5 Scheidetrichter und die Hälfte der Übertragungen der Pufferlösung, welche bei einer detaillierten 8stufigen Verteilung nötig waren.

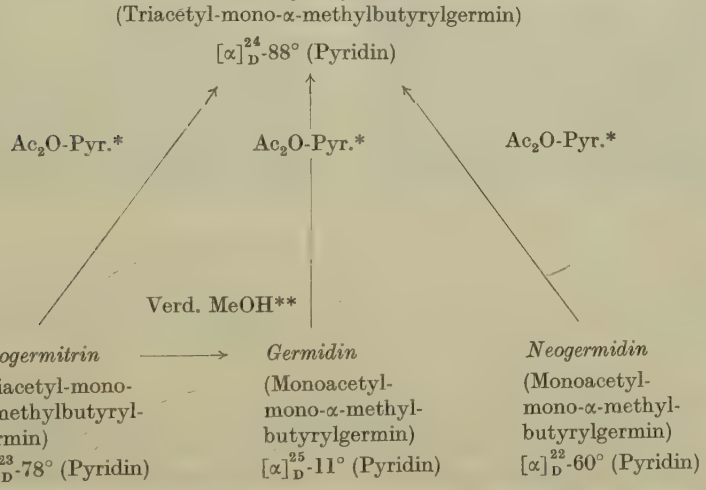
Die organophile Fraktion wurde danach einer 25stufigen Gegenstromverteilung zwischen Benzol und 2molarem Acetatpuffer bei p_H 5,5 unterworfen. Wir erhielten keine diskreten Maxima. Jedoch konnte die basische Substanz aus den Stufen 14—17 aus Äther kristallisiert werden und erwies sich als Neogermitrin. Das Alkaloidmaterial aus den Stufen 4 bis 7 kristallisierte ebenfalls aus Äther; es lieferte Germidin (Kupchan u. Deliwala 1952b).

Um diese Zeit war in unserem Laboratorium eine Untersuchung im Gange, die das Ziel verfolgte, andere, möglicherweise bessere Methoden zur Isolierung der einzelnen kristallisierten Polyester des Germins aus Veratrum album ausfindig zu machen. Die Isolierung und Reinigung dieser Substanzen war bisher nur mit Hilfe von äußerst zeitraubenden Gegenstromverteilungsmethoden möglich gewesen. Es stellte sich heraus, daß mehrere der pharmakologisch wirksamsten Ester der Veratrum-Arten durch Chromatographie der Rohalkaloidmischung an mit Schwefelsäure gewaschenem Aluminiumoxyd in reinem Zustande erhalten werden können. Von besonderem Interesse für uns war die amorphe Alkaloidfraktion von Veratrum album, d. h. die ätherlösliche Mischung, welche man nach der Methode von Craig und Jacobs (1942) nach Abtrennung der ätherunlöslichen Alkaloide erhält. Wenn diese amorphe Alkaloidfraktion in Chloroform gelöst und durch eine Säule von mit Schwefelsäure gewaschenem Aluminiumoxyd gegeben wird, so lassen sich die ersten Alkaloidfraktionen, welche durch Chloroform eluiert werden

können, aus Äther kristallisieren und ergeben Neogermitrin. Das nachfolgende Chloroformeluat kristallisiert ebenfalls aus Äther und liefert Germitetrin B (Nash u. Brooker, 1953).

Wenn die durch Chloroform extrahierbaren Alkaloide von Zygadenus venenosus nach demselben Verfahren an Aluminiumoxyd chromatographiert werden, so läßt sich aus dem ersten Eluat durch Kristallisieren aus Äther ebenfalls Neogermitrin gewinnen. Wenn die Gesamtalkaloide zunächst in die organophile und hydrophile Fraktion getrennt und die beiden Fraktionen wie beschrieben chromatographiert werden, so läßt sich eine weitere Trennung erzielen. Aus aufeinanderfolgenden Eluaten des Chromatogramms der organophilen Fraktion ergäben sich Neogermitrin und Germidin. Die ersten Fraktionen des Eluates des Chromatogramms der hydrophilen Fraktion lieferten dagegen Neogermidin, einen neuen Di-Ester des Germins, der mit Germidin isomer ist. Derselbe Germinester wurde unabhängig von uns von Myers u. Mitarb. (1952) in Veratrum viride gefunden und von diesen Autoren Isogermidin genannt.

Tabelle 1. *Beziehungen zwischen den Germinestern aus Zygadenus venenosus.*



* Essigsäureanhydrid-Pyridin.
** Methylalkohol.

Acetylierung des Neogermidins lieferte Monoacetylneogermitrin. Fried, Numerof und Coy (1952) haben Germidin und Neogermitrin in Monoacetylneogermitrin übergeführt. Diese experimentellen Befunde erweisen, daß der Ort der Bindung des α-Methylbuttersäureesters in jedem der drei aus Zygadenus venenosus isolierten Germinester der Tab. 1 derselbe ist. Die chemischen Beziehungen zwischen den Germinestern sind in Tab. 1 dargestellt.

3. Pharmakologie. Methoden und Ergebnisse.

a) Methoden. Zur Untersuchung der myotonischen Wirkung wurden männliche Frösche, Rana pipiens, verwandt. Beide Sartoriusmuskeln eines Tieres wurden isoliert, in zwei Gefäßen nebeneinander suspendiert und mit Spannungshebeln verbunden. Meist diente der eine der beiden Muskeln zur Durchführung eines Kontrollexperimentes. Die Badflüssigkeit war eine Bicarbonat-Pufferlösung (Krayer, Linstead und Todd, 1943) ähnlich der von McLean und Hastings (1934) beschriebenen Lösung. Sie hatte folgende Zusammensetzung: Natrium-Chlorid 0,5%, Kalium-Chlorid 0,014%, Calcium-Chlorid (wasserfrei) 0,011% und Natrium-Bicarbonat 0,23%. Durch die Lösung wurde fortgesetzt eine Gasmischung von 95% Sauerstoff und 5% Kohlensäure hindurchgeleitet. Das Gesamtvolumen, in welchem der einzelne Muskel suspendiert war, betrug ungefähr 6 cm³.

Zur elektrischen Reizung wurde eine Elektrode am Muskelende, das eben über die Oberfläche der Badflüssigkeit ragte, befestigt; die andere Elektrode wurde in das untere Ende des Badgefäßes so eingesetzt, daß sie mit der Badflüssigkeit in Berührung war. Die Einzelreize waren supramaximale, rechtwinklige Stromstöße, welche durch einen Reizapparat nach Grass erzeugt wurden. Die Intensität des Reizes betrug gewöhnlich 40 Volt; die Reizdauer war 0,5 Millisekunden. Die Reize wurden in Zeitabständen von 2 min wiederholt. Unter diesen Bedingungen ließ sich beim normalen Muskel eine stundenlang gleichbleibende oder nur langsam abnehmende Zuckung erzielen. Gelegentlich wurde die Reizfrequenz auf *einen* Reiz pro Sekunde erhöht, um das Verhalten des mit einer veratrinähnlichen Substanz behandelten Muskels näher zu charakterisieren.

Die Katzen wurden mit Dial-Urethan* (0,7 cm³ je kg intraperitoneal), mit Paraldehyd (1,5—2,7 cm³ je kg per os) oder mit Chloralose (0,09 g je kg intravenös) narkotisiert. Der arterielle Blutdruck wurde mit einem Quecksilbermanometer in einer A. carotis communis oder A. femoralis gemessen. Die Herzfrequenz wurde elektrokardiographisch mit einem Oszillographen nach Grass registriert und in Abständen ausgezählt oder fortlaufend aufgeschrieben. Veränderungen der Atmungsfrequenz wurden mit Hilfe eines Hebels registriert, der über eine Rolle mit der Brustwand des Tieres verbunden war.

Das Herz-Lungen-Präparat des Hundes wurde nach dem Verfahren von Starling hergestellt. Die Einzelheiten der von uns angewandten Technik des Registrierens und der Bestimmung der Suffizienzgrenze wurden von Krayer (1931) ausführlich beschrieben. Das Minutenvolumen wurde mit Hilfe einer Weese-Stromuhr gemessen.

Die Alkaloidfraktionen oder die Reinalkaloide wurden mit einer entsprechenden Menge von 1/10 normaler Salzsäure aufgenommen und mit destilliertem Wasser auf 1:1000 verdünnt. Diese Stammlösung wurde, wenn nötig, entsprechend weiter verdünnt, so daß die Einzelinjektion in der Regel in einer Gesamtmenge von 0,1 bis 0,5 cm³ gegeben wurde. Vor der Injektion wurde die Reaktion durch Zugabe von Spuren festen Natriumbicarbonats auf p_H 6 eingestellt. Die Injektionen erfolgten entweder in die rechte Vena jugularis externa oder in eine der Femoralvenen.

b) Wirkung der Rohextrakte. Die Versuche mit den Rohextrakten**, welche durch Ausziehen mit Alkohol erhalten wurden, bestätigten die alten Versuche von Hunt. Am Sartoriusmuskel trat die charakteristische Veratrinzuckung auf. Bei unserer Methode der intermittierenden Rei-

* 1 cm³ Dial-Urethan enthält in wäßriger Lösung 0,1 g Diallylbarbitursäure, 0,4 g Urethan und 0,4 g Monoäthylharnstoff.

** Über diese Versuche wurde von Yaffe und Kupchan (1950) kurz berichtet.

zung in Abständen von 2 min konnte der veratrinähnliche Effekt 1 Std lang oder länger erhalten werden. Die Kreislaufwirkung und die Wirkung auf die Atmung entsprachen ebenfalls den vom Veratrin her bekannten Wirkungen (Jarisch u. Richter, 1939, weitere Lit. s. Krayer u. Acheson, 1946); Abb. 1 illustriert diese charakteristischen Wirkungen. Unmittelbar nach der intravenösen Injektion (Abb. 1 A) stand die Atmung still; innerhalb einiger Minuten verschwand die schwere Behinderung, und die Atmung wurde mit einer Frequenz, die größer war als normal, wieder aufgenommen; die Atmungsbeschleunigung ging im Verlaufe von Minuten auf die normale Frequenz zurück. Im Kreislaufsystem kam es zu einem abrupten Abfall des Blutdruckes und gleichzeitig zu einer

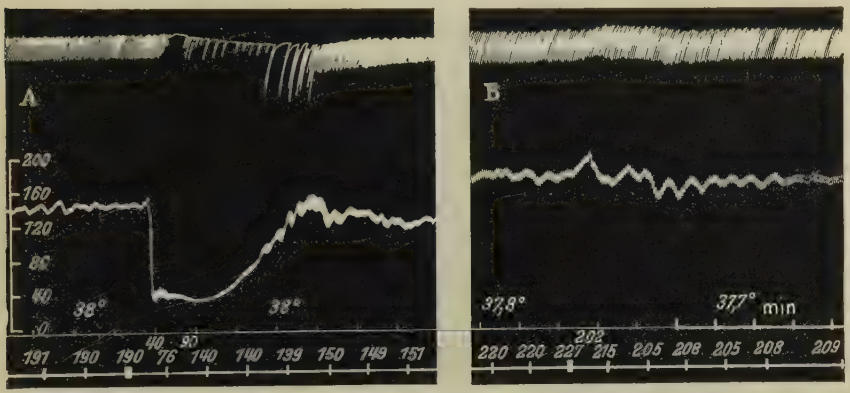


Abb. 1. Die Wirkung der ätherunlöslichen Rohalkaloide aus Zygadenus venenosus auf Atmung und Kreislauf. — Katze (männlich) 2,6 kg; 0,7 cm³ Dial-Urethan je Kilogramm Körpergewicht. Von oben nach unten: Atmung, Blutdruck (linke A. carotis) Eichung links in Millimeter Quecksilber, Zeit in Minuten, Signallinie. Die horizontale Zahlenreihe bedeutet Herzfrequenz je Minute. Die Temperaturen in der Abbildung beziehen sich auf die rektale Temperatur des Tieres. Zwischen Abschnitt A und Abschnitt B war ein Zeitabstand von 40 min. Bei den Signalen in A und B wurde jeweils 0,1 mg Rohalkaloid (ca. 0,04 mg je Kilogramm) intravenös (Femoralvene) injiziert. Während des Versuches in B wurden die Nn. Vagi auf 4° C abgekühlt.

starken Abnahme der Herzfrequenz. Beide Wirkungen gingen im Verlaufe von Minuten vorüber. Wurde die Leitfähigkeit der Vagusnerven unterbrochen, so ließen sich diese Wirkungen nicht mehr in gleicher Weise auslösen. Bei der Dosis, die im Versuch der Abb. 1 angewandt wurde, blieb nach Kühlung der Vagi (Abb. 1 B) die Atmung unverändert und Blutdruck und Herzfrequenz wurden nur sehr wenig vermindert.

Die Untersuchung der Rohalkaloide des Alkoholauszuges ließ zunächst nicht vermuten, daß die Alkaloide der Zygadenusarten pharmakologisch uneinheitlich sind. Bei der weiteren Aufarbeitung stellte sich jedoch bald heraus, daß unter den wirksamen Substanzen mindestens eine war, deren pharmakologische Eigenschaften sich von denjenigen der Esteralkaloide des Cevins unterschieden.

c) Wirkung der Reinalkaloide. Die pharmakologische Prüfung im Verlaufe der chemischen Aufarbeitung hat ergeben, daß die beiden Ester des Zygadenins sich anders verhalten als der Tri-Ester des Germins, Neogermitrin. Die Di-Ester des Germins, Germidin und Neogermidin, und der Mono-Ester Protoveratridin scheinen eine Art Mittelstellung einzunehmen, jedoch sind weitere Versuche mit der ganzen Serie der Germinester nötig, um sie pharmakologisch endgültig zu charakterisieren. Im folgenden soll nur auf die Zygadeninester und auf das Neogermitrin kurz eingegangen werden.

Am Sartoriusmuskel des Frosches verursachten die Zygadeninester, Veratrylzygadenin und Vanillylzygadenin, eine typische Veratrinkon-

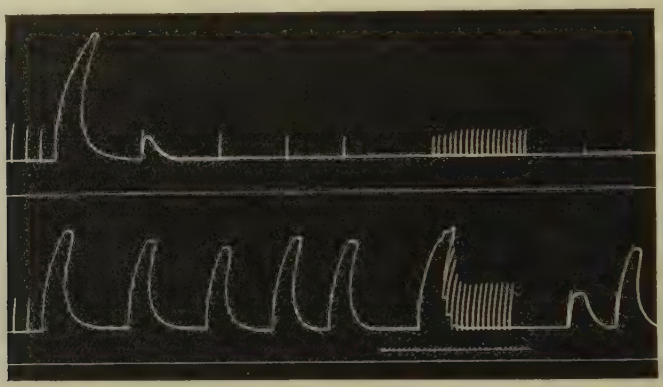


Abb. 2. Die Wirkung des Neogermitrins und des Veratrylzygadenins auf die Zuckung des Skeletmuskels. — Rana pipiens (männlich). Beide Sartoriusmuskeln wurden an Spannungshebeln befestigt und in einem Badvolumen von etwa 6 cm³ Bikarbonat-Pufferlösung aufgehängt. Die Reizung erfolgte alle 2 min (Stärke 40 Volt, Dauer 0,5 Millisekunden) mit rechtwinkeligen Stromstößen. Die Trommel wurde während des größten Teiles der Periode zwischen zwei aufeinanderfolgenden Zuckungen angehalten. Während der Zuckung war die Umlaufgeschwindigkeit gleich derjenigen in der durch die Zeitmarkierung angedeuteten Periode (rechts, Zeit in Sekunden). Während dieser Periode wurden beide Muskeln mit einer Frequenz von 1 je Sekunde gereizt. Obere Kurve: Nach der dritten Reizung wurde Neogermitrin gegeben (Konzentration 1:100000); untere Kurve: Nach der zweiten Reizung wurde Veratrylzygadenin gegeben (Konzentration 1:10 Millionen). Weitere Erklärung siehe Text.

traktion. Mit unserer Anordnung konnte die veränderte Zuckung bei Wahl der richtigen Konzentration (1:5 bis 1:10 Millionen) mehrere Stunden gleichmäßig erhalten werden. Qualitativ und quantitativ entsprach diese Wirkung derjenigen der Cevinester Veratridin und Cevadin.

Neogermitrin war viel weniger wirksam, so daß höhere Konzentrationen angewandt werden mußten, um die Veratrinzuckung überhaupt hervorzurufen. Die Wirkung blieb nicht bestehen, sondern verschwand nach einer mehr oder weniger kurzen Serie von Reizen (im Abstand von 2 min). In kurzer Zeit wurde auch die starke Reizung mit einer Frequenz von *einem* Reiz pro Sekunde unwirksam, die Zuckungshöhe nahm fort-

laufend ab und der Muskel wurde unerregbar. Abb. 2 illustriert den Unterschied zwischen Neogermitrin und Veratrylzygadenin.

Das Verhalten des Neogermitrins gleicht dem des Protoveratrins, dessen Sonderstellung in dieser Hinsicht Boehm (1920) bereits erkannte und ausführlich beschrieb. Wir haben die Versuche Boehms mit einem von Craig und Jacobs (1942) hergestellten Protoveratrin nachgeprüft und bestätigt. Wie wir aus den Untersuchungen von Nash und Brooker (1953) wissen, ist das Protoveratrin eine Mischung aus Protoveratrin A und B, zwei Tetra-Estern des Protoverins.

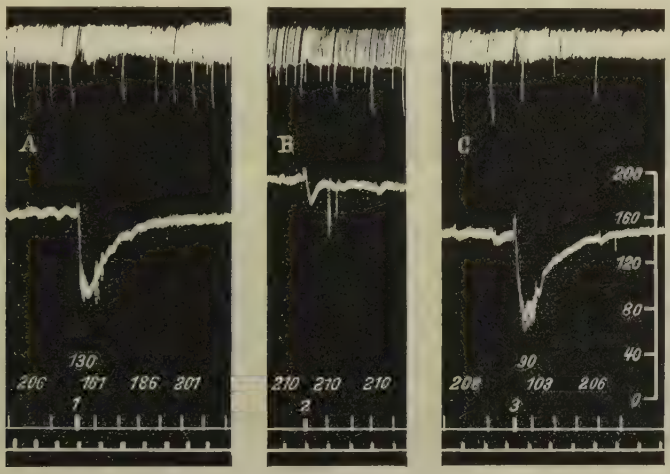


Abb. 3. Die Wirkung von Veratrylzygadenin auf Atmung und Kreislauf. — Katze (männlich) 4,2 kg (15. 5. 1952). Paraldehyd 1,7 cm³ je Kilogramm oral und 0,5 cm³ je Kilogramm intraperitoneal. Von oben nach unten: Atmung; Blutdruck (Femoralarterie) Eichung rechts in Millimeter Quecksilber; Signallinie; Zeit in Minuten. Zwischen A und B war ein Zeitabstand von 22 min, zwischen B und C von 31 min. Die horizontale Zahlenreihe bedeutet Herzfrequenz je Minute. Bei den Zeichen 1, 2 und 3 wurden 0,001 mg Veratrylzygadenin je Kilogramm in die rechte Jugularvene injiziert. Während des Versuches in B waren die Nn. Vagi auf 1° C abgekühlt.

Das Alkamin Zygadenin verursachte keine typische Veratrinkontraktion. In einer Konzentration von 1 : 100000 führte es zu einer erheblichen Zunahme der Zuckungshöhe. In dieser Hinsicht gleicht es den Alkaminen Cevin und Germin.

Die *Kreislaufwirkung* der Ester des Zygadenins an der narkotisierten Katze war sehr flüchtig (Abb. 3). Selbst nach Dosen von 10 γ je kg, welche eine viel stärkere Blutdrucksenkung und Abnahme der Herzfrequenz verursachten, verschwand die Wirkung innerhalb von 5—10 min. Unterbrechung der Leitfähigkeit der Vagusnerven durch Kühlung oder Durchschneidung verhinderte die Wirkung kleiner Dosen auf Blutdruck und Herzfrequenz (Abb. 3). Die Wirkung größerer Dosen wurde in der Regel stark abgeschwächt. Nach Durchschneidung der Vagi im Versuch

der Abb. 3 waren 10 γ je kg ohne blutdrucksenkende Wirkung und hatten keinen Einfluß auf die Herzfrequenz. Atropin-Sulfat (1 mg je kg) verhinderte oder beseitigte die Wirkung auf die Herzfrequenz und schwächte die Wirkung auf den Blutdruck ab.

Das Alkamin Zygadenin in Dosen von 3 mg je kg hatte keine Wirkung auf Atmung und Kreislauf; dasselbe gilt für Cevin (Mendez und Montes 1943).

Am Herzlungenpräparat des Hundes hatten die Zygadeninester eine positiv inotrope Wirkung. Sie war besonders ausgesprochen bei Herzinsuffizienz. Im Versuch der Abb. 4 war eine Herzinsuffizienz durch ein

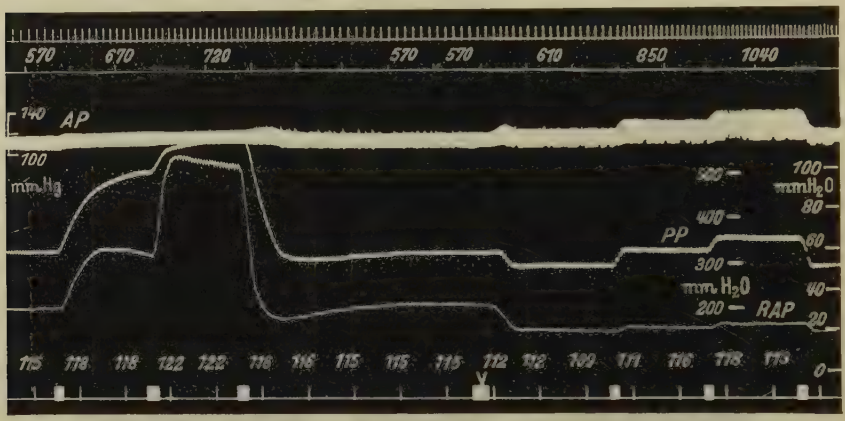


Abb. 4. Die positiv inotrope Herzwirkung des Veratrylzygadenins. — Hund (männlich) etwa 10 kg. Herzlungenpräparat. Gesamtblutvolumen ca. 900 cm³; Bluttemperatur 38° C. Von oben nach unten: Minutenvolumen (Weese-Stromuhr) in 100 cm³; arterieller Druck (*AP*), Eichung links in Millimeter Quecksilber; Druck in der Arteria pulmonalis (*PP*), Eichung rechts in Millimeter Wasser; rechter Vorhofdruck (*RAP*), Eichung ganz rechts in Millimeter Wasser; Signallinie mit Zeit in Minuten. Die obere Zahlenreihe bedeutet Minutenvolumen in Kubikzentimeter, die untere Herzfrequenz je Minute. Beim Zeichen *V* wurde 0,5 mg Veratrylzygadenin nahe der Venenkanüle in den Blutzufluß injiziert. Die drei Zeichen vor und nach *V* zeigen an, daß eine Prüfung der Volumleistungsfähigkeit vorgenommen wurde. Beim ersten und zweiten Zeichen wurde das Blutniveau im Zuflußgefäß jeweils um 50 mm erhöht, beim dritten Zeichen wurde das Blutniveau jeweils wieder um 100 mm (d. h. auf das Ausgangsniveau) gesenkt.

Barbitursäurederivat erzeugt worden. Die Suffizienzgrenze wurde dadurch auf ein Minutenvolumen von 720 cm³ herabgesetzt. Die Zugabe von 0,5 mg Veratrylzygadenin erhöhte das Minutenvolumen innerhalb 1 min von 570 auf 610 cm³ unter gleichzeitiger Abnahme des rechten Vorhofsdruckes und des Pulmonaldruckes. Die nachfolgende Prüfung der Volumleistungsfähigkeit ergab eine Erhöhung der Suffizienzgrenze weit über ein Minutenvolumen von 1040 cm³ hinaus. Gleichzeitig nahm das Herzvolumen stark ab. Intensität und Dauer der Wirkung der Zygadeninester entsprachen derjenigen der Cevinester Veratridin und Cevadin. Wie im Falle des Veratridins (Moe und Krayer, 1943), so konnte auch bei den

Zygadeninestern gezeigt werden, daß das Alkamin der Träger der positiv inotropen Herzwirkung ist, jedoch waren auch von Zygadenin, wie dies bereits für Cevin nachgewiesen wurde, erheblich größere Mengen als vom entsprechenden Ester nötig, um die Herzinsuffizienz zu beheben (Abb. 5).

Die Kreislaufwirkung des zuerst aus Veratrum viride isolierten Neogermitrins wurde bereits von Maison, Gotz und Stutzman (1951) untersucht. In Übereinstimmung mit den Befunden dieser Autoren ergaben unsere Versuche an der narkotisierten Katze, daß die Intensität der Wirkung des Neogermitrins auf Herzfrequenz und Blutdruck erheblich

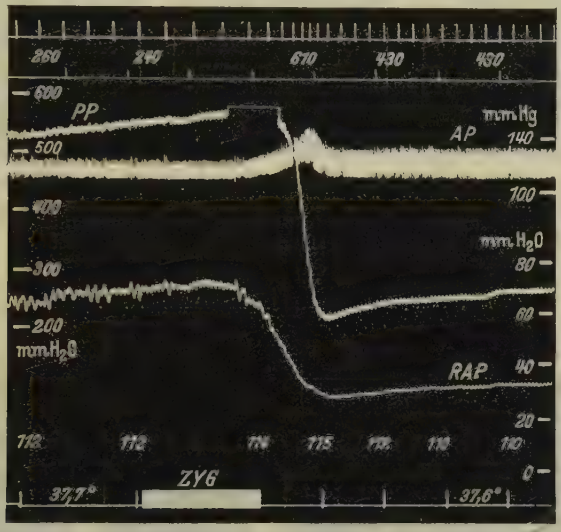


Abb. 5. Die positiv inotrope Herzwirkung des Zygadenins. — Hund (männlich) etwa 10 kg. Herzlungenpräparat. Gesamtblutvolumen ca. 900 cm³. Von oben nach unten: Minutenvolumen (Weese-Stromuhr) in 100 cm³; Druck in der A. pulmonalis (*PP*), Eichung links in Millimeter Wasser; arterieller Blutdruck (*AP*), Eichung rechts oben in Millimeter Quecksilber; rechter Vorhofdruck (*RAP*), Eichung rechts unten in Millimeter Wasser; Signallinie mit Zeit in Minuten. Die obere Zahlenreihe bedeutet Minutenvolumen in Kubikzentimeter, die untere Herzfrequenz je Minute. Die Zahlen 37,7 und 37,6 bedeuten Grad C Bluttemperatur. Beim Zeichen *ZYP.* wurden 50 mg Zygadenin nahe der Venenkanüle in den Blutzufluß injiziert.

größer ist, und daß die Wirkung länger andauert als diejenige der Cevinester. Demgemäß übertrifft die Wirksamkeit in bezug auf Intensität und Dauer auch diejenige der Zygadeninester; wie bei den letzteren konnten bei entsprechender Wahl der Dosis durch Kühlung (oder Durchschneidung) der Vagusnerven die Herzfrequenzabnahme und die Blutdrucksenkung vollständig verhindert oder abgeschwächt werden (Abb. 6).

Am Herzlungenpräparat hatte Neogermitrin eine positiv inotrope Wirkung, und zwar schon bei einer Dosis von 10 γ. Jedoch war die therapeutische Breite gering, da Gesamtdosen von 20 γ bereits Rhythmusstörungen und Ventrikelflimmern hervorriefen. Diese Gefahr war

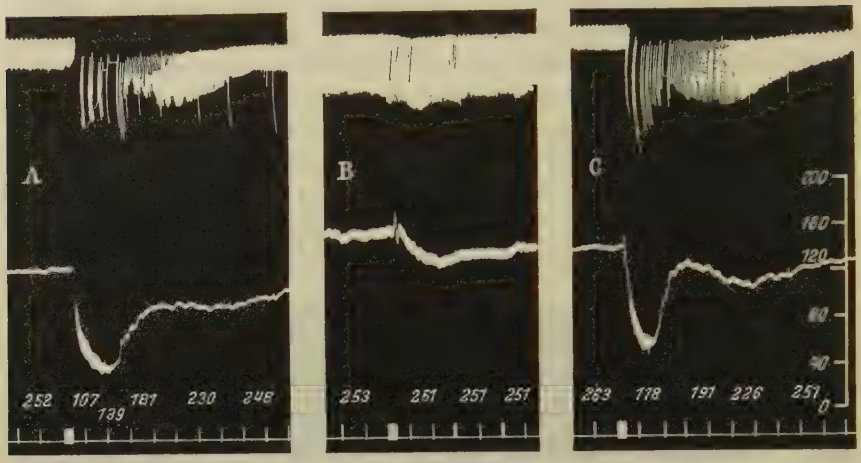


Abb. 6. Die Wirkung des Neogermitrins auf Atmung und Kreislauf. — Katze (weiblich) 3,2 kg (16. 4. 1952). Paraldehyd 1,7 cm³ je Kilogramm oral und 0,8 cm³ je Kilogramm intraperitoneal. Von oben nach unten: Atmung; arterieller Blutdruck (Femoralarterie) Eichung rechts in Millimeter Quecksilber; Signallinie mit Zeit in Minuten. Die horizontale Zahlenreihe bedeutet Herzfrequenz je Minute. Während des Versuches in B waren die Nn. Vagi auf 3° C abgekühlt. Die Rektaltemperatur des Tieres während des ganzen Versuches betrug 37,5° C. Beim Zeichen in A, B und C wurde jeweils 0,001 mg Neogermitrin je Kilogramm in die Femoralvene injiziert.

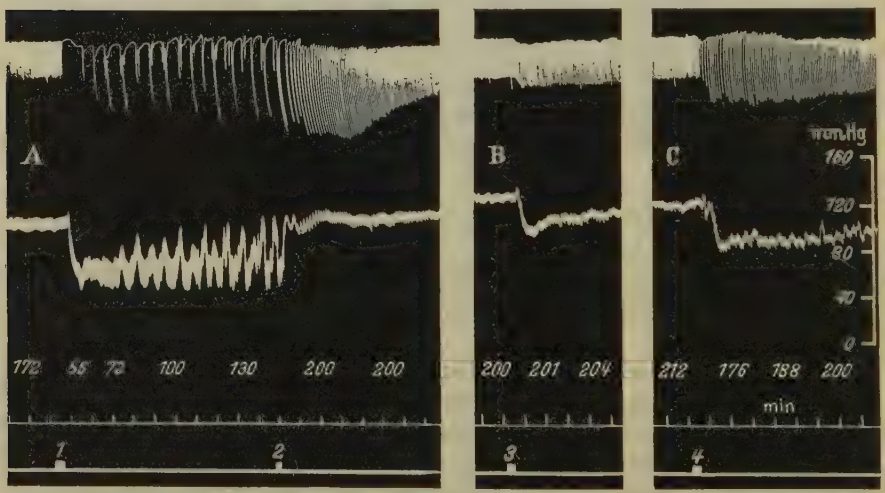


Abb. 7. Die Wirkung von Vanillylzygadenin auf Atmung und Kreislauf nach der Durchschneidung der Nn. Vagi. — Katze (männlich) 1,7 kg (15. 10. 1951) Dial-Urethan 0,8 cm³ je Kilogramm intraperitoneal). Von oben nach unten: Atmung; Arterieller Blutdruck, Eichung rechts in Millimeter Quecksilber; Zeit in Minuten; Signallinie. Die horizontale Zahlenreihe bedeutet Herzfrequenz je Minute. Beim Zeichen *1* in A und bei *3* in B wurden 0,1 mg (0,06 mg je Kilogramm) Vanillylzygadenin intravenös injiziert; bei *2* in A wurden beide Vagusnerven durchschnitten; bei *4* in C wurden 0,3 mg (0,18 mg je Kilogramm) Vanillylzygadenin intravenös injiziert. Zwischen A und B war ein Zeitabstand von 55 min, zwischen B und C von 11 min.

besonders groß, wenn das Herz belastet wurde. Auch in dieser Hinsicht erwies sich Neogermitrin dem Protoveratrin (KRAYER, MOE und MENDEZ 1944) ähnlich.

In bezug auf den hemmenden *Einfluß auf die Atmung* glichen die Zygadeninester ebenfalls qualitativ und quantitativ den Cevinestern und waren erheblich weniger wirksam als Neogermitrin. Atropin hatte, wenn überhaupt, nur eine geringe Gegenwirkung. Unterbrechung der Leitfähigkeit der Vagusnerven durch Kühlung verhinderte oder beseitigte dagegen die Atmungshemmung wenigstens im Bereiche der niederen wirksamen Dosen. Jedoch konnte auch nach Durchschneidung der Vagi noch eine deutliche Wirkung auf Atmung (und Kreislauf) selbst mit den Zygadeninestern ausgelöst werden, sofern die Dosis hoch genug gewählt wurde (Abb. 7).

Tabelle 2. *Alkaloide aus Zygadenus venenosus.*

Alkamin	*Formel*	*Schmelzpunkt**	$[\alpha]_D^{**}$
Zygadenin	$C_{27}H_{43}O_7N$	218—220°	—48,5° (Chloroform)
Germin	$C_{27}H_{43}O_8N$	220—225°	+4° (Äthylalkohol)

Ester	*Formel*	*Schmelzpunkt**	$[\alpha]_D^{**}$	*Alkamin*	*Säuren*
Veratryl-zygadenin	$C_{36}H_{51}O_{10}N$	270—271°	—27° (Chlorof.)	Zygaden.	Veratrinsäure
Vanillyl-zygadenin	$C_{35}H_{49}O_{10}N$	258—259°	—27,5° (Chlorof.)	Zygaden.	Vanillinsäure
Protoveratridin	$C_{32}H_{51}O_9N$	272—273°	— 9° (Pyridin)	Germin	α-Methylbuttersäure
Germidin	$C_{34}H_{53}O_{10}N$	242—244°	—11° (Pyridin)	Germin	α-Methylbuttersäure Essigsäure
Neogermidin	$C_{34}H_{53}O_{10}N$	221—223°	—60° (Pyridin)	Germin	α-Methylbuttersäure Essigsäure
Neogermitrin	$C_{36}H_{55}O_{11}N$	237—238°	—78° (Pyridin)	Germin	α-Methylbuttersäure Essigsäure Essigsäure

* Alle Schmelzpunkte sind korrigiert. Alle Substanzen schmelzen unter Zersetzung.

** Die Bestimmungen der optischen Drehungen wurden bei folgenden Temperaturen vorgenommen. Zygadenin 22, Germin 24, Veratrylzygadenin 20, Vanillylzygadenin 23° C. Die Temperaturen für die Germinester mit Ausnahme von Protoveratridin (22° C) sind in Tab. 1 angegeben.

Zusammenfassung.

Es besteht eine nahe Beziehung zwischen den aktiven Prinzipien des Genus Zygadenus und des Genus Veratrum der Liliazeen. Die chemischen Studien, über welche in der vorliegenden Arbeit berichtet wurde, führten zur Isolierung von acht reinen kristallisierten Alkaloiden aus Zygadenus venenosus. Die Namen der Alkaloide, ihre empirischen Formeln, ihre Schmelzpunkte und ihre optischen Rotationen sind in der Tab. 2 zusammengestellt. Die beiden Alkaloide Zygadenin und Germin sind tertiäre Amine. Die anderen sechs sind Esteralkaloide dieser beiden Alkamine. Die Zygadeninester Veratrylzygadenin und Vanillylzygadenin sind neue Alkaloide und wurden bisher außerhalb des Genus Zygadenus nicht gefunden. Die vier Germinester dagegen sind auch aus Untersuchungen verschiedener Veratrumarten bekannt. Unsere Versuche haben jedoch zum ersten Male auf Zygadenus als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Germinestern hingewiesen.

Die pharmakologischen Untersuchungen, welche bisher am Sartoriusmuskel des Frosches, an der narkotisierten Katze und am Herzlungenpräparat des Hundes durchgeführt wurden, haben eine große Ähnlichkeit zwischen den pharmakologischen Eigenschaften des Zygadenins bzw. der Zygadeninester Veratrylzygadenin und Vanillylzygadenin und denjenigen des Cevins bzw. der Cevinester Veratridin und Cevadin ergeben. Neogermitrin, ein Tri-Ester des Germins, ist in bezug auf seine pharmakologischen Eigenschaften dem Protoveratrin ähnlich. Weitere Versuche mit den anderen Germinestern sind notwendig, um sie pharmakologisch zureichend zu charakterisieren.

Literatur.

Boehm, R.: Heffters Handbuch der exper. Pharmakol. **2**, Teil 1, 249 (1920). — Cameron, K.: Northw. Med. (Seattle) **51**, 682 (1952). — Collier, P.: Report. U.S. Commissioner of Agriculture, 1881/82, S. 547. — Craig, L. C., and W. A. Jacobs: J. of Biol. Chem. **143**, 427 (1942). — Craig, L. C.: Fortschr. chem. Forschg. **1**, 292, 302, 312 (1949). — Fried, F., P. Numerof and N. M. Coy: J. Amer. Chem. Soc. **74**, 3041 (1952). — Fried, J., H. L. White and O. Wintersteiner: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 4621 (1950). — Heyl, F. W., and F. E. Hepner: J. Amer. Chem. Soc. **35**, 803 (1913). — Heyl, F. W., F. E. Hepner and S. K. Loy: J. Amer. Chem. Soc. **35**, 258 (1913). — Heyl, F. W., and M. E. Herr: J. Amer. Chem. Soc. **71**, 1751 (1949). — Hunt, R.: Amer. J. Physiol. **6**, xix (1902). — Jarisch, A., u. H. Richter: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **193**, 347, 355 (1939). — Krayer, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **162**, 1 (1931). — Krayer, O., and G. H. Acheson: Physiologic. Rev. **26**, 383 (1946). — Krayer, O., R. P. Linstead and D. Todd: J. of Pharmacol. **77**, 113 (1943). — Krayer, O., G. K. Moe and R. Mendez: J. of Pharmacol. **82**, 167 (1944). — Kupchan, S. M., and C. V. Deliwala: J. Amer. Chem. Soc. **74**, 2382 (1952a); **74**, 3202 (1952b). — Maison, G. L., E. Gotz and J. W. Stutzman: J. of Pharmacol. **103**, 74 (1951). — Marsh, C. D., and A. B. Clawson: U.S. Dept. of Agriculture, Farmers' Bulletin No. 1273, 1—10, 1922 (revidiert 1929). — Bulletin No. 1240, 1—13, 1924. — Marsh, C. D., A. B. Clawson,

and H. Marsh: U.S. Dept. of Agriculture, Bulletin No. 125, 1—46, 1915. — Marsh, C. D., A. B. Clawson, and G. C. Roe: U.S. Dept. of Agriculture, Bulletin No. 1376, 1—13, 1926. — McLean, F. C., and A. B. Hastings: J. of Biol. Chem. **107**, 337 (1934). — Mendez, R., and G. Montes: J. of Pharmacol. **78**, 238 (1943). — Mitchell, P. H., and G. Smith: Amer. J. Physiol. **28**, 319 (1911). — Moe, G. K., and O. Krayer: J. of Pharmacol. **77**, 220 (1943). — Myers, G. S., Glen, W. L., P. Morozovitch, R. Barber and G. A. Grant: J. Amer. Chem. Soc. **74**, 3198 (1952). — Nash, H. A., and R. N. Brooker: J. Amer. Chem. Soc. **75**, 1942 (1953). — Slade, H. B.: Amer. J. Pharmacy **77**, 262 (1905). — Vejux-Tyrode, M.: J. Med. Research **11** (New series **6**), 399 (1904). — Varlakov, M. N.: Farmatsiya **1941**, No. 1, 27—29; nach Chem. Abstr. **38**, 1075^2 (1944). — Yaffe, S. J., and S. M. Kupchan: Fed. Proc. **9**, 326 (1950).

Prof. Dr. Otto Krayer,
Pharmakol. Inst. der Harvard Medical School, Boston, Massachusetts/USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 386—396 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. Häusler).

Beiträge zur Frage der Herzglykosid-Entgiftung.

I. Mitteilung: Digitoxin*.

Von
H. F. Häusler.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. März 1953.)

Unter Herzglykosid-Entgiftung könnte man einerseits eine Dosis-wirkungsverminderung oder, was interessanter und von praktischer Wichtigkeit sein würde, die Erzielung eines größeren Abstandes zwischen einer bereits therapeutisch wirksamen und der toxischen Dosis, also eine Vergrößerung der therapeutischen Breite verstehen, andererseits eine Entgiftung in vivo meinen, nämlich bei bereits eingetretener Vergiftung des Herzens die rasche Wegschaffung des zu viel Haftenden bzw. der eingetretenen Zustandsänderung[37, 38], was bei der schon lange üblichen intravenösen Strophanthin- oder (der neuerdings wiederum aufgekommenen) Digitoxin-Darreichung von besonderer Bedeutung wäre. Trotz der Mehrdeutigkeit des Wortes „Herzglykosid-Entgiftung" haben wir diesen Ausdruck gewählt, da die Grenzen fließend sind und zwischen den angedeuteten Extremen: Entgiftung in vitro — Entgiftung in vivo Übergänge bestehen, wie nicht nur unsere Versuche zeigen sollen; beispielsweise könnte die Tatsache, daß Schwermetalle mit Herzglykosiden Komplexbindungen eingehen, wie in vitro auch in vivo zurechtbestehen, so daß Chenoweth u. Mitarb.[9, 24] die Wirkung der Herzglykoside mit ihrer Fähigkeit in Beziehung bringen „to chelate intracellular copper".

Über die Bedeutung der Schwermetalle, besonders des Cu für den Stoffwechsel haben wir selbst Untersuchungen[17, 18, 19, 50, 55] angestellt, auch am Herzen[20] die (möglicherweise therapeutische und) toxische Cu-Wirkung, aber gleichzeitig deren Entgiftung durch Komplexbildner nachweisen können und verfolgen diese durch äußere Umstände unterbrochene Arbeitsrichtung weiter; Metalle als Spurenelemente[23, 48] sind ja von großer Bedeutung, beispielsweise in bestimmter Bindung bzw. Stellung als Zentralatome in Fermenten für den Elektronenaustausch zwischen Co-Ferment oder prosthetischer Gruppe einerseits und dem spezifischen Protein andererseits, wodurch sich gewisse Pharmakawirkungen auf Fermente[2, 22] verstehen lassen.

* Herrn Hofrat Prof. Dr. Otto Loewi zum 80. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

Über die hier zu schildernden Versuche wurde bereits vor der Berliner Pharmakologentagung 1938 berichtet[21], doch kam ihre Veröffentlichung aus äußeren Gründen nicht zustande.

Sie gehen auf Bemühungen zurück, den Vergleich eines Standards mit dem auszuwertenden Herzglykosid an einem und demselben Objekt vorzunehmen und an diesem bei dem gleichzeitigen Vorteil, mit geringen Mengen arbeiten zu können, die Möglichkeit von Einrahmungsversuchen zu schaffen: Wegen seiner hohen Empfindlichkeit ist das Froschherz sicherlich eines der besten Objekte für die Untersuchung kleiner Mengen von Herzglykosiden und bietet gegenüber den Versuchen am Ganztier überdies den Vorteil des spezifischen Wirkungsortes. Doch konnte wegen der schweren Auswaschbarkeit der Herzglykosidvergiftung bisher der Vergleich zwischen Standard und auszuwertender Probe nicht an *einem* Herzen vorgenommen, vielmehr mußten immer mehrere Herzen zum Vergleich herangezogen werden, wobei die bekannten individuellen Unterschiede sowie die dadurch bedingte Streuung die entsprechende Beobachtung der dafür geltenden statistischen Bearbeitung der Ergebnisse notwendig machen. Dagegen würde sich im Falle einer raschen und restlosen Entgiftung, ähnlich wie das bei der Cu-Vergiftung gelungen ist[20], die Aussicht eröffnen, an einem und demselben Herzen mehrere Auswertungen vorzunehmen.

Über die Möglichkeit der Verwendung dieses Testes auch zur quantitativen biologischen Auswertung von herzwirksamen Glykosiden an einem einzigen isolierten Froschherzen soll an einer anderen Stelle berichtet werden.

Die Entscheidung, ob ein Extrakt ein herzwirksames Glykosid darstellt oder enthält, und die meisten Methoden der Auswertung gründen sich irgendwie auf die Beobachtung des Zustandekommens eines Herzstillstandes in Kontrakturstellung, sei es am ganzen Tier[8] oder am isolierten Herzen: Schon Straub[52] hatte eine Wirksamkeitsskala mit 4 Stufen für verschiedene Strophanthinmengen aufgestellt und als Kriterium die Entwicklung, die Art, die Dauer und die Beeinflußbarkeit der Kontraktur benützt, welche systolisch oder in Mittelstellung oder diastolisch sein kann, letzteres als „Folge einer maximal gewordenen negativ-inotropen Wirkung". Überdies kommen phänologisch der Herzglykosidwirkung ähnliche Bilder auch bei der Einwirkung anderer Substanzen vor, z. B. bei der erwähnten Cu-Vergiftung[20], und zwar ebenfalls Steigerung der Amplituden, Hebung der Fußpunkte, diastolischer Stillstand usw., und deshalb erscheint diese Eigentümlichkeit der Vergiftung durch Herzglykoside als alleinige Basis für eine Einstellungsmethode nicht geeignet. Zudem handelt es sich bei der Beobachtung der Kontraktur lediglich um die Konstatierung einer *Zustands*änderung und nicht um die Prüfung einer *Funktion*; eine solche wäre etwa die bei glykosidvergifteten Herzen auftretende Steigerung der Kontraktur nach Dehnung oder Innendruckerhöhung, doch ist sie wegen der schweren Dosierbarkeit nicht verwendbar. Außerdem sind beide Kriterien erst greifbar und überdies das zweite erst dann prüfbar, wenn die Glykosidwirkung bei Anwendung höherer Konzentrationen voll ausgebildet ist.

Deshalb erschien uns sowohl für die Prüfung verschiedener glykosidhaltiger Pflanzen- als auch anderer Extrakte eine ausschließlich für die Erkennung von Herzglykosiden charakteristische Eigenheit wünschens-

wert, welche nicht nur eine funktionelle Methode darstellt, sondern während aller Stadien, also auch bei noch nicht völlig ausgebildeter Endwirkung, vorliegt. Ähnlich wie bei der Cu-Vergiftung am Froschherzen dessen Nichtansprechbarkeit auf Acetylcholin und Adrenalin als Kriterium verwendet werden konnte[20], erwies sich für die vorliegende Frage die Reaktion herzglykosidbehandelter Froschherzen auf calciumarmes Regime als charakteristisch, und zwar nicht nur hinsichtlich der noch kurz zu streifenden Eignung zur Feststellung des Vorhandenseins herzwirksamer Glykoside überhaupt, sondern vor allem zur Funktionsprüfung der Aus- bzw. Rückbildung der durch Herzglykoside gesetzten Zustandsänderung. Loewi[40, 41] hat bekanntlich aus seinen Versuchen an strophanthinvergifteten Herzen den Schluß gezogen, daß die Herzglykoside „für Calcium sensibilisieren".

Diese von ihm aufrechterhaltene[42] Meinung ist nicht nur therapeutisch mißverstanden worden, indem sogar von industrieller Seite Mischpräparate hergestellt bzw. Herzglykoside gleichzeitig mit (viel zu großen Mengen) Calcium verabreicht wurden, wobei deren Toxizität wesentlich erhöht wird (vgl. z. B. Billigheimer[4, 5] u. a.[1, 6, 13, 14, 16, 34, 35, 36, 39, 45, 46, 47]) und es am Menschen sogar zu Todesfällen kam[7], während andererseits eine gleichzeitige vorsichtige Darreichung von Calcium unter Umständen durchaus nützlich sein kann[25, 33, 43, 54], sondern hat auch von theoretischer Seite zu Kontroversen geführt (vgl. z. B. Berliner[3], Weese[57], Smith u. Mitarb.[51]).

Calciumarme Ringerlösung kann als Test für das Bestehen einer herzglykosidbedingten Kontraktur verwendet werden, mag diese je nach der angewandten Herzglykosidkonzentration und der Zeit ihrer Einwirkung in Systole oder in Mittelstellung oder in Diastole eingetreten sein: Ersetzt man die gewöhnliche Ringerlösung durch calciumarme oder -freie, so wird, freilich nur für die Dauer ihrer Anwesenheit im Herzen, eine solche Kontraktur, in welcher Stellung immer, aufgehoben, und das Herz schlägt anscheinend wiederum normal. Bei dieser scheinbar erholenden Wirkung handelt es sich aber keinesfalls um eine Entgiftung des Herzens im Sinne eines Auswaschens, wie das bekanntlich prompt bei Ionenwirkungen geht und auch bei den vegetativen Überträgersubstanzen, oder der Aufhebung der durch das Herzglykosid bewirkten Zustandsänderung. Denn wechselt man auf gewöhnlichen Ringer, so tritt die frühere Kontraktur sofort wieder in Erscheinung und der Vorgang läßt sich mehrmals wiederholen, wie wir ausnahmslos beobachten konnten, und führt zu Bildern wie sie z. B. auch Fischer[10] gefunden hat.

Dieser Effekt calciumarmen Regimes tritt, wie ich in einer mit Gager u. Zechner[11, 12, 58, 59] gemeinsam geplanten Arbeit feststellen konnte, nur bei herzwirksamen Glykosiden auf und geht den chemischen Proben (wie Legaltest, Baljetprobe) konform, z. B. fand ich ihn positiv bei Extrakten aus Adonisarten, Apocynum cannabinum, Asclepias syriaca, Convallaria majalis, Digitalis ambigua, lanata, sibiriaca, Helleborus niger, Oleander, Scilla maritima, Viscum album, nicht aber mit Glykosiden wie Condurangin[58], Vincetoxin[11], Hoyin[59], Metaplexin[12] bzw.

Extrakten aus Eranthis hiemalis, Globularia cordifolia, Scrophularia nodosa und vernalis. Dieser Test hat sich bewährt, wenn immer es sich darum handelte, möglichst rasch, aber eindeutig qualitativ, wenn auch mengenmäßig zunächst nur schätzungsweise, das Vorhandensein digitalisähnlicher Wirkstoffe festzustellen.

Über spontane Erholung glykosidvergifteter Froschherzen hat bereits GOTTLIEB[15] berichtet, und besonders LENDLE und seine Schule (vgl. z. B. KINGISEPP[28]) haben die spontane Erholungsfähigkeit isolierter, mit verschiedenen herzwirksamen Glykosiden vergifteter Froschherzen des Näheren untersucht. Auch ich hatte immer wieder bei der Prüfung verschiedener herzglykosidhaltiger Pflanzenextrakte bzw. von Reinglykosiden an Froschherzen in der STRAUBschen Anordnung beobachtet, daß sie sich, wenn sie, etwa über Mittag, unter gewöhnlichem RINGER belassen oder, wenn es sich um elektrisch gereizte Kammerpräparate handelte, abgeschaltet worden waren, bis zum Nachmittag oft völlig oder mindestens teilweise erholt hatten. Dieser Befund, der durch ad hoc angestellte Versuche bestätigt wurde, konnte dahin gedeutet werden, daß während dieser Zeit entweder das an die Herzmuskulatur fixierte Glykosid wiederum in die Flüssigkeit abgeschieden oder aber in diese aus dem Herzen etwas ausgetreten war, was die Vergiftung behoben hatte. Schien die erste Möglichkeit schon wegen der Haftfestigkeit und Unauswaschbarkeit der Gifte unwahrscheinlich, so sprachen auch Versuche dagegen, die zeigten, daß selbst RINGER, wenn er sich nur etwa 1 Std in *normalen*, entweder vom Oberherzen rhythmisierten oder in elektrisch gereizten oder auch in nichtschlagenden Herzen befunden hatte, die Eigenschaft aufwies, ein glykosidvergiftetes Froschherz, woferne es nicht schon völlig stillstand, in der kurzen Zeit von 15—30 min wiederum zu normaler Tätigkeit zu bringen. Es mußte also von dem normalen Herzen etwas in die Füllflüssigkeit übergegangen sein, das ihr eine entgiftende Fähigkeit verlieh. Dieser Frage nachzugehen, wurden zunächst am digitoxinvergifteten Froschherzen wäßrige Extrakte aus Frosch- u. a. Herzen bzw. Herzabschnitten auf eine solche entgiftende Wirksamkeit untersucht.

Methodik.

Die Hauptversuche wurden während der Wintermonate 1937/38 an Herzen von ungarischen Esculenten angestellt, die in der STRAUBschen Anordnung schlugen. Die Herzen erhielten ihren Rhythmus entweder von dem mit den Kammern im natürlichen Zusammenhang belassenen Oberherzen oder wurden, um die Wirkung an der isolierten Kammer zu studieren, nach Stannius II ligiert und die Kammern durch rhythmische, über eine Glimmstrecke erfolgende Kondensatorentladungen[49] getrieben, wobei eine punktförmige der Basis des Herzens angelegte Elektrode[56] benützt wurde. Unser RINGER hatte die Zusammensetzung: NaCl 0,7%, $CaCl_2$ 0,01%, KCl 0,01%, $NaHCO_3$ 0,05%. Zur Prüfung auf die eingetretene Herzglykosidwirkung wurde RINGER der gleichen, nur in bezug auf den Calciumgehalt veränderten Zusammensetzung verwendet; so bedeutet z. B. Ca/10, daß der Ca-Gehalt auf 0,001% vermindert worden war. Zur Vergiftung diente Digitoxinum Merck crystallisatum, von dem eine 1‰ Stammlösung in 50% Alkohol vorrätig

gehalten wurde, aus der vor dem Versuche durch Verdünnung mit Ringer die gewünschten Konzentrationen (1:50000 –1:500000) jedesmal frisch bereitet wurden; der Alkoholgehalt hat in solchen Verdünnungen (1%—0,1%) bekanntlich keinen Einfluß auf die Herzglykosidwirkung, wovon wir uns in Kontrollversuchen noch besonders überzeugt hatten.

Bereitung der Extrakte und Fällungen. Zunächst wurden die Herzen bzw. deren Teile nach Ausbluten und grober Zerkleinerung einfach in Ringer ohne Bicarbonat mit ausgeglühtem Quarzsand, dessen Inertheit sich in Kontrollversuchen gezeigt hatte, zerrieben und die nach Zentrifugieren abgehobene und auf den üblichen Bicarbonatgehalt gebrachte Flüssigkeit in entsprechenden Verdünnungen geprüft, die an sich am normalen Herzen keine Wirkung hatten. Weitere Extrakte wurden bereitet, indem das Herz nach der Zerreibung in der 10fachen Menge bicarbonatfreier Ringerlösung aufgenommen und kurz aufgekocht worden war; diese Extrakte wurden im Kühlschrank bis zu 2 Tagen aufgehoben und erst kurz vor Verwendung filtriert, mit n/10 NaOH auf p_H 7,6 gebracht und als solche bzw. in Verdünnungen zugesetzt. Zur Fällung wurden die o. e. ungekochten Extrakte verwendet: Sie erfolgte entweder durch Zusatz von basischem Bleiacetat oder Hgacetat so lange, bis kein weiterer Niederschlag mehr entstand, und blieb dann 24 Std stehen. Anschließend wurde auf Jenaer Glasfilter Nr. 4 schwach abgesaugt, der Filterrückstand in Wasser aufgeschwemmt und dann so lange Schwefelwasserstoff eingeleitet, bis alles Blei bzw. Quecksilber gefällt war. Hierauf wurde auf Jenaer Glasfilter Nr. 4 schwach abgesaugt und das Filtrat sofort im Vakuum auf etwa 1 ml eingeengt, wobei auch der Schwefelwasserstoff gänzlich entfernt wurde. Auch in die Filtrate der Pb- bzw. Hg-Fällung wurde H_2S eingeleitet, bis alles Metall entfernt war, und in derselben Weise auf 1 ml eingeengt. Die auf diese Art aus je 2 Fällungen bzw. Filtraten erhaltenen 4 Proben wurden zur Prüfung verwendet, um festzustellen, ob und wo das wirksame Agens erhalten geblieben war.

Ergebnisse.

Die Wirkung des calciumarmen Regimes an einem Straubschen Herzen vor und nach Herzglykosidvergiftungen ist zur Illustration des von uns sogenannten Ca/10-Testes und seiner Bedeutung als Funktionsprüfung für die eingetretene Zustandsänderung aus Abb. 1 zu ersehen: Das mit natürlicher Frequenz schlagende Herz reagierte auf Ringer, dessen Ca-Gehalt auf ein Zehntel herabgesetzt war, auf den relativen Kaliumüberschuß, wie nicht anders zu erwarten war, negativ inotrop. Als etwa nach 20 min Einwirkung von Digitoxin 1 : 200 000 in gewöhnlichem Ringer seine deutliche Wirkung eingetreten war, wurde diese Kontraktur sofort durch Ca/10-Ringer gelöst und das Herz, dessen Amplituden sowohl durch Senkung der Fußpunkte als auch durch Steigerung der systolischen Erhebungen fast die frühere Größe erreicht hatten, schlug anscheinend normal, ging aber nach Wechsel auf gewöhnlichen Ringer sofort wiederum in die frühere Kontrakturstellung. Noch deutlicher sieht man das auf der unteren Partie der Abb. 1, wo das inzwischen (vgl. unten) entgiftete Herz als Stannius II-Präparat elektrisch getrieben wurde: Hier war bei einer Digitoxinkonzentration von 1 : 50 000 bereits nach 7 min eine vollständige Kontraktur in Systole zustande gekommen, die sich aber selbst in diesem Stadium auf Ca/10-Ringer temporär immer

wieder lösen ließ, obwohl das Herz auf gewöhnlichen RINGER sofort gleichsam zusammenschnurrte.

Den Verlauf einer Entgiftung mit einem einfachen Kochextrakt einer Rinderherzspitze zeigt Abb. 2 (Praktikum-Versuch vom 18. 12. 1952) an einem im normalen, vom Oberherzen diktierten Rhythmus belassenen Froschherzen: Das auf das 40fache des Ausgangsgewichtes verdünnte Filtrat der Kochprobe, welches vorher am Herzen keine Wirkung gezeigt hatte, konnte das durch Digitoxin 1:100000 in völligen systolischen Stillstand geratene Herz wiederum zu normalem Schlagen bringen; freilich dauert es bei solchen Versuchen, wo die regenerierende Lösung nicht wenigstens einmal eingepreßt wurde und deshalb den Kontakt mit der Herzmuskulatur nur langsam finden kann, entsprechend länger, bis diese entgiftet wird. Dagegen ist in diesem Versuch gut zu sehen, wie sich auf die gleiche Digitoxinkonzentration eine neuerliche Vergiftung auszubilden beginnt, aber durch dieselbe Verdünnung der Kochprobe in einer knappen Viertelstunde rückbildet und das Herz seine frühere Amplitudenhöhe wiedergewinnt; wie wir uns auch in diesem Versuch überzeugt haben, tritt nach der Ent-

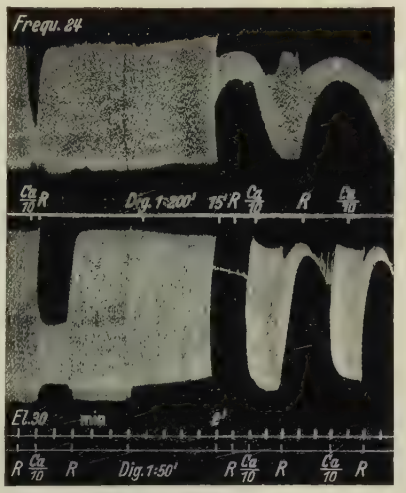


Abb. 1. Isoliertes Froschherz in STRAUBscher Anordnung. Obere Kurve: Spontanschlagend. Untere Kurve: Stannius II, elektrisch getrieben mit Frequenz 30/min (El. 30). Dig. 1:200′ = Digitoxin 1:200000, Dig. 1:50′ = Digitoxin 1:50000.

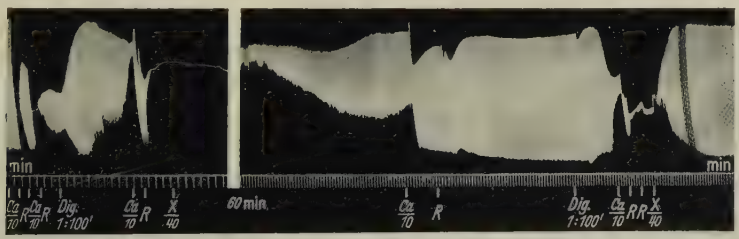


Abb. 2. Isoliertes Froschherz in STRAUBscher Anordnung. Dig. 1:100′ = Digitoxin 1:100000. χ/40 = Kochextrakt aus Rinderherzmuskulatur: Konzentration entspricht 1 g Herzspitze auf 40 ml Nährlösung.

giftung und als Symptom ihrer Vollständigkeit auf Ca/10-RINGER die bei normalen Herzen übliche negativ-inotrope (Kaliumüberschuß-) Wirkung wiederum auf, während für die Dauer der Kontraktur durch Ca/10-RINGER deren Lösung erfolgt.

Zeigte die Abb. 2 das Prinzipielle an einem gewöhnlichen Kochextrakt, so sei in Abb. 3 ein der Analyse gewidmeter Versuch mit dem Regenerat aus einer Hg-Acetatfällung wiedergegeben, das auf das 100-fache des ursprünglichen Gewichtes des Herzens (aus der Muskulatur der linken Kammer eines Kaninchens) verdünnt war, der zeigt, wie der Ca/10-Test während der Vergiftung, aber auch im Verlaufe der Entgiftung gleichsam immer wieder (jedoch in zunehmend geringerem Ausmaße) die Wirkung von gewöhnlichem Ringer auf ein normales Herz imitiert,

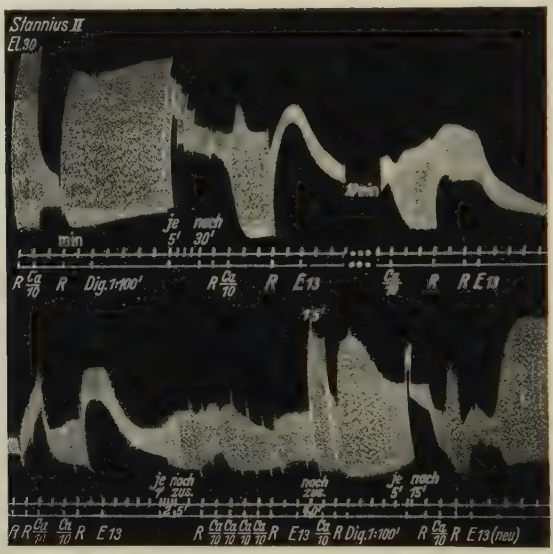


Abb. 3. Isoliertes Froschherz in Straubscher Anordnung. Stannius II, elektrisch getrieben mit Frequenz 30/min (El. 30). Dig. 1:100′ = Digitoxin 1:100 000. E 13 = Extrakt-Fällung mit Hg-acetat aus linker Herzkammer (Kaninchen): Konzentration entspricht 1 g Muskel auf 100 ml Nährlösung.

während das Wechseln auf diesen sofort wiederum die Kontraktur in Erscheinung treten und damit die durch die Herzglykosidvergiftung bewirkte Zustandsänderung erkennen läßt. Nach Entgiftung durch die am unvergifteten Herzen wirkungslose Extrakt-Fällung E 13 reagierte das Herz auf Ca/10-Ringer wie üblich, wurde durch dieselbe Digitoxinkonzentration neuerlich vergiftet und konnte durch eine zweite Fällungsprobe (E 13 neu) wiederum zur Norm gebracht werden.

In der Abbildung sieht man im Verlauf der Digitoxinvergiftung und -entgiftung die Kontraktur in verschiedenen Abständen von den ursprünglichen Fußpunkten ausgebildet und kann an einigen Stellen, wenigstens angedeutet, beobachten, wie die verschiedenen Höhen sich wellenförmig einstellen, besonders wenn der Ca-Gehalt des Ringers gesteigert wird, wie durch Umschalten von Ca/10-Ringer auf gewöhnlichen. In ad hoc angestellten Versuchen, über die gesondert berichtet werden soll, sahen wir, besonders bei Verwendung von kaliumarmem oder gar -freiem

Ringer (bei normalem Ca-Gehalt), direkt die Ausbildung von „Tonuswellen", die phänologisch etwa durchaus den respiratorischen Blutdruckschwankungen gleichen.

Wurden anfänglich nur Frosch- und Krötenherzen auf ihre entgiftende Wirksamkeit untersucht, so kam z. B. im Versuch der Abb. 2 ein gewöhnliches Kochextrakt aus einer Rinderherzspitze zur Anwendung und bei Abb. 3 handelt es sich um Muskulatur aus der linken Herzkammer eines Kaninchens. Untersucht wurden außerdem Herzen bzw. Herzteile von Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Hunden und Menschen; auch sämtliche Säugerherzen zeigten eine ebenso stark entgiftende Eigenschaft wie die der Batrachier, und zwar enthielt die Kammermuskulatur bei weitem mehr an wirksamem Prinzip als die Vorhöfe.

Die bisherigen Versuche mit Skeletmuskulatur hatten größtenteils negative Ergebnisse, ebenso Versuche mit den bekannten Muskel-Extrakten bzw. Wirkstoffen wie ATP u. a. -- ATP, über dessen Beziehung zur Tätigkeit des Froschherzens neuerdings Meyer[41] sowie zu herzwirksamen Glykosiden Kimura u. Mitarb.[26, 27] Untersuchungen angestellt haben, wurde beispielsweise auch deshalb geprüft, weil sich erwiesen hatte, daß bei Gegenwart von Phosphat (0,1 cm^3 froschisotonischer Natriumphosphatpufferlösung eines p_H 7,6 auf 1 cm^3 Ringer) die Entgiftung der Herzextrakte in kürzerer Zeit gelang als ohne Phosphatzusatz. Nun gehören gerade Phosphate neben einigen anderen Substanzen, z. B. Glucose, zu den wenigen Stoffen, denen in der Literatur (vgl. z. B. Straub[53]) eine Behebung des digitalisierten Zustandes nachgerühmt wird.

Tatsächlich übt Phosphat allein eine günstige Wirkung auf das systolisch stillgelegte Herz aus, aber im Vergleich zu den Herzextrakten nur in geringem Maße, während deren Zusatz die Fuß- und Spitzenpunkte der Amplitude *viel rascher* und *dauernd* auseinandergehen läßt und, wie die Prüfung mit calciumarmem Ringer zeigt, das Herz wiederum zum normalen Schlagen bringt (vgl. Kombinationswirkungen, Kohn u. Mitarb.[29–32]).

Die Untersuchung der Eigenschaften des entgiftenden Prinzips wurde dadurch gefördert, daß sich das Dialysat der Herzverreibungen als voll wirksam erwies und die Einengung auf dem Wasserbade ohne Verluste gelang; daß das regenerierende Agens kochbeständig ist, geht ja schon z. B. aus dem der Abb. 2 zugrundeliegenden Versuche hervor. Dagegen wird es durch Veraschung vollkommen zerstört, so daß es sich nicht um Salz- bzw. Ionenwirkungen handeln kann, also auch nicht um reine Phosphatwirkungen. Es verträgt die Bestrahlung mit gewöhnlichem und UV-Licht, wird aber durch Alkali inaktiviert, während es in schwachen Säuren, z. B. n/100 HCl und Essigsäure durch mehrere Wochen und voll wirksam bleibt. Die Untersuchung des Verhaltens der Substanz gegen die üblichen Fällungsmittel ergab folgendes: Behandlung mit basischem Pb-Acetat zerstört das wirksame Prinzip, denn es findet sich weder in der Fällung noch im Filtrat, und dieser Befund geht seiner Inaktivierung durch Alkali konform. Ebenso ist das Filtrat der Hg-acetat-Fällung

wirkungslos, dagegen findet es sich, wie der in Abb. 3 wiedergegebene Versuch zeigt, in der Hg-acetat-Fällung, aus der das Quecksilber durch Behandlung mit H_2S in üblicher Weise entfernt worden war.

Wie die Entgiftung zustande kommt, ist noch unklar. Wir haben zunächst auch die Möglichkeit geprüft, ob durch das entgiftende Prinzip Digitoxin bereits in vitro entgiftet wird; doch sind alle diesbezüglichen Versuche gleich dem dahin gerichteten Bemühen, eine Vergiftung durch Digitoxin etwa durch seine optimalen Lösungsmittel wie Chloroform oder durch Substanzen, die es chemisch binden wie Saponin, zu beeinflussen, negativ verlaufen, mit anderen Worten, es gelang nur die bereits eingetretene Digitoxinvergiftung zu beheben und das Digitoxin selbst wurde nicht entgiftet: Denn der Verlauf der Vergiftung mit stärkeren Digitoxinkonzentrationen als 1:100000 wurde nicht geändert, gleichgültig ob Extrakte, die das wirksame Agens enthalten, vorher mit dem Digitoxin außerhalb des Herzens mehr oder weniger lange zusammen waren oder dem Herzen gleichzeitig mit dem Digitoxin zugeführt wurden.

Das Zustandekommen einer starken Digitoxinvergiftung wird durch die gleichzeitige Anwesenheit des entgiftenden Prinzips nicht verhindert, sondern nur verzögert: Bisher gelang es durch seinen gleichzeitigen Zusatz nur, Digitoxinkonzentrationen bis zu 1:200000 nicht mehr wirksam werden zu lassen; dagegen konnte jede bereits eingetretene Digitoxinvergiftung, die durch Konzentrationen bis zu 1:50000 zustande gekommen war, behoben werden.

Auch am ganzen Frosch wirkten sich Injektionen von Herzextrakten verschiedenster Bereitung in einer Herabsetzung bzw. Aufhebung der Digitoxingiftigkeit entsprechender Dosen aus; so konnten im Gegensatz zu unbehandelten Fröschen die mit Extrakten injizierten Tiere gegen eine sichere Dosis letalis geschützt werden.

Wenn die bisherigen Versuche den Ca/10-Test auch als durchaus geeignet zur Feststellung der durch Herzglykoside hervorgerufenen Zustandsänderung am isolierten Froschherzen erkennen ließen, so harrt die eingangs aufgeworfene Frage noch eindeutiger Beantwortung, ob sich die bisher als *qualitativer* Test verwendete Eigentümlichkeit Ca-armer Ringerlösungen, während der Dauer ihrer Einwirkung die herzglykosidbedingte Kontraktur zu lösen, auch zu einer *quantitativen* biologischen Methode der Auswertung von Herzglykosiden am isolierten Froschherzen ausbauen läßt. Doch bietet sich die Möglichkeit zu deren Ausarbeitung durch den gelungenen Nachweis, daß man ein und dasselbe Herz mehrmals hintereinander mit Digitoxin *ver*giften und *ent*giften kann, eine deshalb verlockende Möglichkeit, weil sie Vergleichsuntersuchungen an einem und demselben Objekt und noch dazu an dem „Wirkungsort" für Herzglykoside gestatten würde, als welcher das Froschherz wegen seiner großen Empfindlichkeit auch geringe Herzglykosidkonzentrationen erfassen ließe, somit ein besonders günstiges Testobjekt darstellen würde.

Zusammenfassung.

In Batrachier- und Säugerherzen, besonders in der Kammermuskulatur, ist ein Prinzip enthalten, dessen bisher erhobene Eigenschaften beschrieben werden; es behebt die durch Digitoxin am isolierten Froschherzen bewirkte Zustandsänderung, ohne das Herzglykosid selbst zu

entgiften. Da es auf diese Weise gelingt, das Testobjekt mehrmals zu *ver*giften und zu *ent*giften, eröffnet sich die Möglichkeit der Verwendung eines einzelnen isolierten Froschherzens zur — zunächst qualitativen — Testung geringer Mengen von Herzglykosiden. Als Test zur Feststellung der herzglykosidbedingten Zustandsänderung wird die Eigenschaft der am normalen Herzen negativ inotrop wirkenden calciumarmen Ringerlösung, die selbst keine entgiftende Fähigkeit besitzt, verwendet, die herzglykosidbedingte Kontraktur temporär zu lösen.

Literatur.

[1] Baker, J. B. E.: Brit. J. Pharmacol. **2**, 259 (1947). — [2] Baudisch, O., u. J. Konecny: Z. physik. Ther. **3**, 1 (1950). — [3] Berliner, K.: Amer. Heart J. **8**, 548 (1933). — [4] Billigheimer, E.: Z. klin. Med. **100**, 411 (1924). — [5] Billigheimer, E.: Klin. Wschr. **8**, 724 (1929). — [6] Boris, F.: Diss. Santiago de Chile 1948. — [7] Bower, J. O., and H. A. K. Mengle: J. Amer. Med. Assoc. **106**, 1151 (1936). — [8] Burn, J. H., D. J. Finney and L. G. Goodwin: Biological Standardization. Oxford: Univ. Press 1950. — [9] Chenoweth, M. B., D. R. Bennett and R. Parry: J. of Pharmacol. **103**, 340 (1951). — [10] Fischer, I.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **130**, 194 (1928). — [11] Gager, R., u. L. Zechner: Arch. Pharmaz. **276**, 431 (1938). — [12] Gager, R.: Österr. Apotheker-Zt. **1**, 37 (1947). — [13] Gold, H., and N. Kwit: Science (Lancaster, Pa.) **2**, 330 (1937). — [14] Golden, H., and M. Brams: Ann. Int. Med. **11**, 1084 (1938). — [15] Gottlieb, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **83**, 117 (1918). — [16] Guigan, S., and F. Higgins: J. Labor. a. Clin. Med. **23**, 839 (1938). — [17] Häusler, H., u. H. Schnetz (I. Mitt.): Biochem. Z. **275**, 187 (1935). — [18] Häusler, H., u. H. Schnetz (II. Mitt.): Biochem. Z. **275**, 204 (1935). — [19] Häusler, H., u. L. Vogl (IV. Mitt.): Biochem. Z. **287**, 405 (1936). — [20] Häusler, H. (VI. Mitt.): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **183**, 211 (1936). — [21] Häusler, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **190**, 212 (1938). — [22] Häusler, H.: Wien. klin. Wschr. **61**, 559 (1949). — [23] Häusler, H.: Referat d. I. Österr. Balneol. Fachtagung Bad Gastein 1949: Z. physik. Ther. **3**, 22 (1950). — [24] Hardman, H., D. R. Bennett, J. F. Palmer, R. Parry and M. B. Chenoweth: Fed. Proc. (Washington) **11**, 84 (1952). — [25] Hochrein, M.: Z. ärztl. Fortbildg **31**, 672 (1939). — [26] Kimura, T. E., and K. P. du Bois: Science (Lancaster, Pa.) **106**, 370 (1947). — [27] Kimura, T. E.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **69**, 419 (1948). — [28] Kingisepp, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **187**, 117 (1937). — [29] Kohn, R., u. B. C. Costopanagiotis (I. Mitt.): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **169** 146 (1933). — [30] Kohn, R., u. B. C. Costopanagiotis (II. Mitt.): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **170**, 226 (1933). — [31] Kohn, R., u. B. C. Costopanagiotis (III. Mitt.): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **171**, 151 (1933). — [32] Kohn, R. (IV. Mitt.): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **173**, 341 (1933). — [33] Kutschera, H.: Wien. med. Wschr. **102**, 965 (1952). — [34] La Barre, M. J., et J. van Heerswynghels: C. r. Soc. Biol. Paris **130**, 71 (1939). — [35] La Barre, M. J.: Acta biol. Belg. **1**, 475 (1941). — [36] La Barre, M. J.: Bull. Acad. Méd. Belg. **8**, 172 (1943). — [37] Lendle, L.: Heffters Hdb. d. exp. Pharm. **1**, 11 (1935). — [38] Lendle, L.: Wien. klin. Wschr. **50**, 1243 (1937). — [39] Liebermann, L.: J. of Pharmacol. **47**, 183 (1933). — [40] Loewi, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **82**, 131 (1917). — [41] Loewi, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **83**, 366 (1918). — [42] Loewi, O., and M. Blumenfeld: J. of Pharmacol. **83**, 96 (1945). — [43] Merten, A.: Med. Welt **14**, 556 (1940). — [44] Meyer, A. E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 154 (1951). — [45] Salter, W. T., L. J. Sciarini and J. Gemmel: J. of Pharmacol.

96, 372 (1949). — [46] Salter, W. T., L. J. Sciarini and B. Rubin: J. of Pharmacol. **97**, 314 (1949). — [47] Salter, W. T., and E. A. Runels: Amer. J. Physiol. **165**, 520 (1951). — [48] Vgl. z. B. Scharrer, K.: Biochemie der Spurenelemente. Berlin: P. Arey 1940. — [49] Scheminzky, F.: Pflügers Arch. **225**, 303 (1930). — [50] Schnetz, H. (III. Mitt.): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **178**, 420 (1935). — [51] Smith, P. K., A. K. Winkler and H. H. Hoff: Arch. Int. Med. **64**, 322 (1939). — [52] Straub, W.: Biochem. Z. **28**, 392 (1910). — [53] Straub, W.: Biochem. Z. **127**, 255 (1921). — [54] Szekely, S.: Lancet **2**, XXIV, 67 (1940). — [55] Vogl, L. (V. Mitt.): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **183**, 198 (1936). — [56] Wagner, R.: Z. Biol. **84**, 557 (1926). — [57] Weese, H.: Digitalis. Leipzig: Thieme 1936. — [58] Zechner, L.: Pharmaz. Mhefte, Wien **19**, 96 (1938). — [59] Zechner, L., u. R. Gager: Sci. pharmaceut., Wien **9**, 93 (1938).

Prof. Dr. H. F. Häusler, Pharmakol. Institut d. Univ. Graz/Österreich.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 397—407 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bern
(Direktor: Prof. Dr. W. Wilbrandt).

Die quantitative Abhängigkeit der Strophanthosidwirkung auf das Froschherz von der Tätigkeit des Herzens und von der Glykosidkonzentration*.

Von
W. Wilbrandt, K. Brawand und P. N. Witt.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. März 1953).

Den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit bilden zwei Beobachtungen, die von Weizsäcker im Jahre 1913 und von Levi vor kurzem gemacht worden sind.

Weizsäcker beschäftigte sich mit der allgemeinen Frage, wie weit pharmakologische Wirkungen nicht nur von Konzentration und Einwirkungszeit des Pharmakons, sondern auch von der Tätigkeit des beeinflußten Organs bestimmt werden. Als Objekt wählte er den elektrisch gereizten Froschventrikel unter der Einwirkung von g-Strophanthin. Als Kriterium benützte er die Zeit bis zum Herzstillstand. Er fand, daß diese Zeit bei gleicher Strophanthinkonzentration von der Reizfrequenz abhängt. In einem Versuch beispielsweise stand ein Herz bei einer Reizfrequenz von 15 pro Minute nach 30 min still, ein anderes bei einer Frequenz von 35 pro Minute nach 14 min. Die Zahl der Kontraktionen der beiden Herzen bis zum Stillstand waren 490 und 500. Am nicht gereizten Herzen, das in Weizsäckers Versuchen allerdings eine Anzahl Spontankontraktionen ausführte, schien g-Strophanthin mindestens weniger wirksam zu sein als am gereizten. Eine reizfreie Vorperiode von 12 min in Strophanthin-Ringer beeinflußte die Zeit bis zum Herzstillstand in einer anschließenden Reizperiode praktisch nicht, in beiden Fällen betrug sie etwa 13 min. Längere Vorperioden verkürzten allerdings die Stillstandszeit.

Die Weizsäckerschen Beobachtungen haben wenig bleibenden Widerhall gefunden. Issekuz, der ähnliche Versuche mit Digitoxin durchführte, fand eine Abhängigkeit von der Reizfrequenz nur bei sehr niedrigen Konzentrationen. H. Fischer fand, ebenfalls in Versuchen mit Digitoxin, die Beeinflussung von Geschwindigkeit und Intensität der Wirkung durch die Frequenz nur von untergeordneter Bedeutung und außerdem sehr inkonstant.

Wohl zum Teil unter dem Einfluß dieser Beobachtungen ist der Weizsäckersche Befund weitgehend in Vergessenheit geraten.

Ausgehend von anderen Fragestellungen hat vor kurzem Levi bei Untersuchungen mit k-Strophanthosid ähnliche Beobachtungen gemacht. Auch er arbeitete mit dem elektrisch gereizten Froschventrikelpräparat, benützte aber als Kriterium nicht die Zeit bis zum Herzstillstand, sondern die Zunahme der Spannungsentwicklung bei isometrischer Tätigkeit des Herzens unter Calciummangel.

* Herrn Professor Dr. O. Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

Die Verwendung dieses Kriteriums geht aus von der bekannten Beobachtung von Otto Loewi (1918), daß die Wirkung von Strophanthin auf den Herznmuskel unter anderem in einer Sensibilisierung des Muskels gegen Calcium besteht, indem einerseits die Herabsetzung der Herztätigkeit bei Calciummangel durch Strophanthin kompensiert wird, andererseits die systolische Kontrakturwirkung des Strophanthins durch Entfernung des Calciums, wenigstens vorübergehend, aufgehoben werden kann. Neuerdings haben Blumenfeld u. Loewi (1945) gezeigt, daß auch die diastolische Wirkung kleiner Glykosidkonzentrationen auf Sensibilisierung gegenüber Calcium zurückgeführt werden kann.

Gegenüber dem Herzstillstand hat das von Levi verwendete Kriterium vor allem den Vorteil, daß die beobachtete Wirkung unter gewissen Voraussetzungen reversibel ist. Außerdem setzt sie praktisch ohne Latenz ein.

Levi fand, daß die Wirkung einer Strophanthosidkonzentration von 5 γ/cc sich langsam entwickelt und (bei einer Reizfrequenz von 10/min) in einer Zeit von etwa 20—30 min bis zu einem Maximum verstärkt, um dann einer Abnahme der entwickelten Spannung Platz zu machen.

Wäre diese Zeit der Wirkungsentfaltung auf das Eindringen des Glykosids in die Herzmuskelfaser durch Diffusion zu beziehen, so müßte eine reizfreie Periode von gleicher Länge in der gleichen Strophanthosidkonzentration die Wirkung in gleicher Weise zur Entfaltung bringen. Bei Beginn der elektrischen Reizung nach einer solchen Vorperiode müßte also dann die Wirkung bereits maximal zu beobachten sein. Stattdessen ergab sich, daß unter diesen Umständen die Wirkung bei Reizungsbeginn praktisch null ist und sich dann in etwa der gleichen Zeit bis zum Maximum entwickelt, in der sie das sonst zu tun pflegt. Wird nach der reizfreien Periode vor Einschaltung der Reizung die strophanthosidhaltige Ringerlösung entfernt und durch strophanthosidfreie unter mehrmaligem Auswaschen ersetzt, so kommt fast gar keine Wirkung zustande.

Die Levische Beobachtung stimmt also mit derjenigen von Weizsäcker darin überein, daß die Wirkung von Strophanthin bzw. Strophanthosid von der Tätigkeit des Herzens abhängt. Sie geht jedoch über den früheren Befund darin hinaus, daß die Abhängigkeit von der Herztätigkeit sich auch bei Benützung eines anderen Kriteriums nachweisen läßt, bei dem schwächere und reversible Wirkungen (bei 4mal niedrigeren Konzentrationen) beobachtet werden.

Für beide Befunde bleibt die Frage offen, welches Element der Herztätigkeit für die Entfaltung der Wirkung unentbehrlich ist, die Erregung oder die Kontraktion.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit etwas veränderter Methodik erstens die Frage geprüft werden, ob zwischen der Strophanthosidwirkung und der Zahl der Kontraktionen bei Anwesenheit von Strophanthosid eine klare quantitative Relation nachgewiesen werden kann. Zweitens sollte untersucht werden, welche quantitative Abhängigkeit zwischen der Wirkung und der Konzentration des Strophanthosids besteht.

Methodik.

Gegenüber dem Vorgehen von Levi wurde vor allem eines geändert: die calciumarme Ringerlösung wurde nur vorübergehend als Test für die Strophanthosidwirkung verwendet. Dagegen erfolgte die Einwirkung des Strophanthosids unter normalen Bedingungen, d. h. in normaler Ringerlösung. Zweck dieser Änderung war, eine fortschreitende Schädigung des Herzens durch die lange Einwirkung der

calciumarmen Lösung zu verhindern, ferner den Calciummangel als etwaigen modifizierenden Faktor für die Wirkung des Strophanthosids auszuschalten und schließlich, die Bedingungen für die Beurteilung der Reversibilität zu verbessern.

Die benützte Anordnung ist in Abb. 1 wiedergegeben. Das Herz *H* ist an einer Doppelkanüle *DK* befestigt, die durch den Vorhof in die Kammer eingeführt wird. Von den beiden Wegen der Doppelkanüle ist der eine mit der Druckregistrierung *DR* verbunden (die in Abb. 2 im einzelnen dargestellt und dort eingehender be-

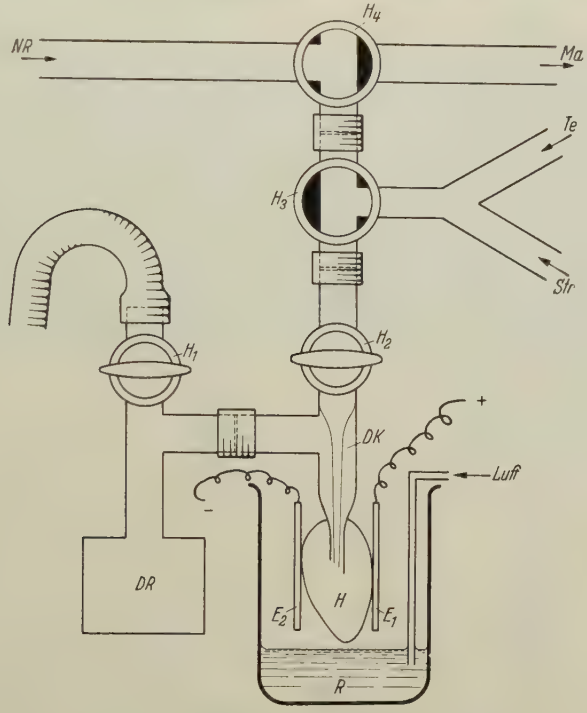


Abb. 1. Schema der benützten Gesamtanordnung. Näheres im Text.

schrieben ist), sowie mit einem Hahn, H_1, durch den das System entleert bzw. durchgespült werden kann. Der andere Weg führt durch einen Hahn H_2, zu 4 verschiedenen Rohranschlüssen, die durch die Dreiweghahnen H_3 und H_4 wechselweise angeschlossen werden können. Durch die mit *Str*, *Te* und *NR* bezeichneten Anschlüsse wird Strophanthosidlösung *Str*, „Testlösung" *Te* (calciumarme Ringerlösung), oder normale Ringerlösung *NR* in das Herz eingeführt. Die vierte Verbindung *Ma* führt zu einem Manometer mit variablem Druck, das erstens für die Messung der hier zugeführten Eichdrucke benützt wird, zweitens zur Einstellung eines bestimmten konstanten Anfangsdrucks zu Versuchsbeginn (50 mm Wasser, siehe unten).

Das Herz mit den Reizelektroden befindet sich in einer feuchten Kammer über luftdurchperlter Ringerlösung. Es wird mit einer Frequenz von 10/min durch Kondensatorenentladungen rhythmisch gereizt. Einmal pro Minute fällt ein Reiz aus, so daß die registrierten Kontraktionsperioden von 1 min klar gegeneinander abgegrenzt sind.

Für die Druckregistrierung wurde eine zweistufige pneumatische Übertragungsanordnung benützt. Die in den beiden Stufen verwendeten Prinzipien sind in einer früheren Veröffentlichung[17] ausführlicher dargestellt worden, dagegen ist die in unserem Institut mehrfach verwendete und bewährte Kombination einer druckübertragenden Stufe ohne Verstärkung (jedoch mit geringer Volumverschiebung) und einer zweiten druckverstärkenden Stufe bisher nicht beschrieben worden. Sie ist in Abb. 2 wiedergegeben.

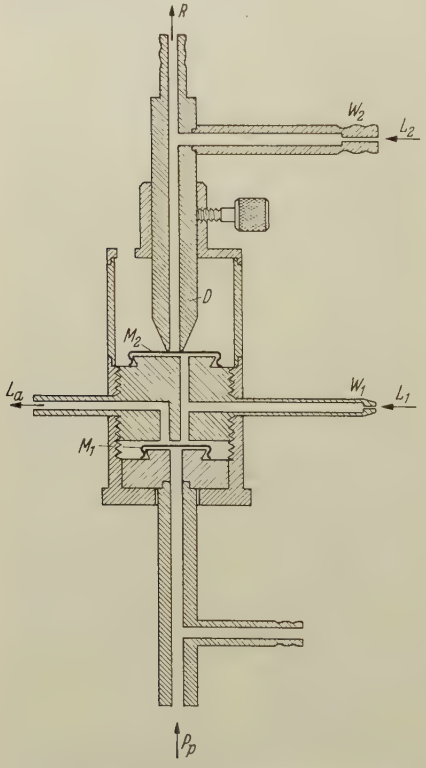


Abb. 2. Schema der kombinierten zweistufigen Anordnung zur Druckübertragung mit geringer Volumverschiebung und Druckverstärkung. Näheres im Text.

Der zu messende bzw. zu registrierende Primärdruck Pp wirkt von unten auf eine Gummimembran, M_1. Gegen die Membran bläst der Luftstrom, L_1, der durch den Widerstand W_1 eintritt und durch den Luftausgang L_a austritt. Bei Steigerung des Primärdrucks entsteht ein Staudruck, der die zweite Membran M_2 spannt. Im Luftraum der zweiten Stufe, in der der Luftstrom L_2 durch den Widerstand W_2 ein- und durch die Düse D austritt, entsteht dann ein Staudruck, der über R auf die Registriervorrichtung geführt wird. Für die Registrierung wurde eine Metallkapsel benützt.

Die Volumelastizität der Übertragungsvorrichtung ist klein. Sie beträgt für den Überträger allein 10 mm³/100 mm Hg. Praktisch wird sie in der Gesamtanordnung etwas vergrößert durch die Berührung mit dem Gummischlauch zwischen der Doppelkanüle und dem Drucküberträger, die aber durch Glas-auf-Glas-Verbindung auf ein Minimum reduziert wurde.

Das Vorgehen bei den Versuchen war folgendes. Die Lösungen wurden durch die für sie bestimmten Anschlüsse (siehe Abb. 1) in den Vertrikel eingeführt, wobei das Präparat im allgemeinen etwa 2 min mit einer Menge von etwa 10 cm³ der neuen Lösung durchspült wurde. Daraufhin wurde der Hahn H_1 geschlossen, H_2 blieb noch offen. Da sämtliche Vorratsgefäße höher lagen als 5 cm über dem Herzen, war nun der Druck entsprechend hoch. Jetzt wurde die Verbindung mit dem Vorratsgefäß unterbrochen und einige Sekunden eine Verbindung mit dem auf einen Druck von 50 mm Wasser eingestellten Manometer Ma hergestellt. Daraufhin wurde der Hahn H_2 geschlossen und die Registrierung begonnen. Während des Durchströmens und Füllens des Präparats wurde im allgemeinen die Reizung fortgesetzt mit Ausnahme der Füllung mit Strophanthosidlösungen, die ohne Reizung durchgeführt wurde.

Als Test für die Strophanthosidwirkung wurde die Spannungsentwicklung in calciumarmen Ringerlösungen benützt. Die verwendete Ringerlösung war die-

jenige, die bei v. MURALT als Muskelphosphat-RINGER bezeichnet wird und eine Konzentration von 0,02% Calciumchlorid besitzt. Diese Calciumkonzentration wurde als 100% bezeichnet und die Angaben über die Konzentrationen der calciumarmen Lösungen sind auf diesen Wert zu beziehen. 5% Ca bedeutet demnach einen Gehalt von 0,001% $CaCl_2$.

Die Calciumkonzentration der „Testlösung" war nicht immer die gleiche. Sie wurde so gewählt, daß die entwickelte Spannung höchstens 60% der Spannung in der Vorperiode mit RINGERlösung betrug.

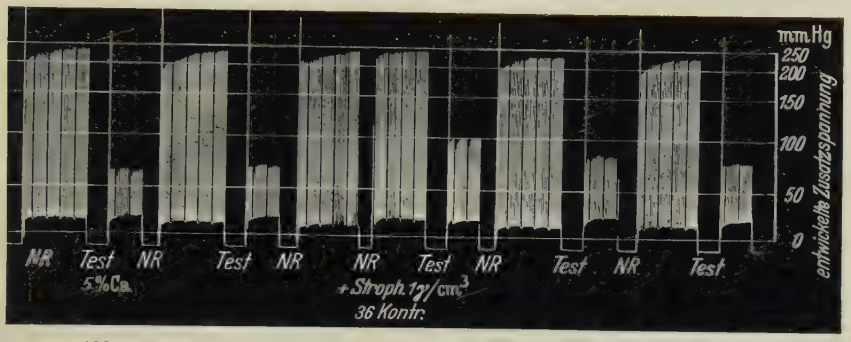


Abb. 3. Beispiel eines Versuchs mit 1,0 γ/cm³ Strophanthosid und 36 Kontraktionen.

Die Lösungen wurden mindestens alle 10 min erneuert bzw. gewechselt. Strophanthosidlösungen wurden im allgemeinen erst angewendet, wenn der „Test" 3 mal den gleichen Spannungswert ergeben hatte.

Die Einwirkungszeiten des Strophanthosids wurden unabhängig von der Kontraktionszahl in jeder Versuchsserie konstant gehalten. Sie betrugen im allgemeinen 5 min.

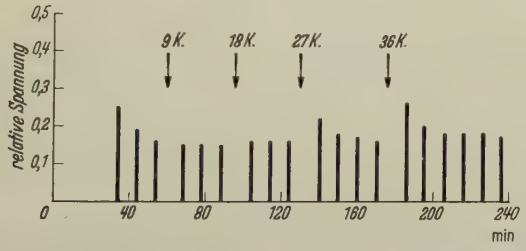


Abb. 4. Beispiel einer Auswertung eines Versuchs. Konzentration des Strophanthosids 0,25 γ/cm³. Bei den Pfeilen wirkt Strophanthosid je 5 min lang auf den Ventrikel ein, wobei das Herz in der ersten Periode 9 mal, in der zweiten 18 mal, in der dritten 27 mal, in der vierten 36 mal gereizt wird.

Abb. 3 zeigt ein Beispiel eines Versuchs mit 1,0 γ/cm³ Strophanthosid und 36 Kontraktionen. Der mit Null bezeichnete Druck ist in dieser wie in allen anderen Abbildungen der Basisdruck von 50 mm Wasser, der (siehe oben) bei Beginn aller Versuche eingestellt wurde.

Für die Auswertung wurden alle entwickelten Spannungszunahmen mit Hilfe der Eichungen in Zentimeter Wasser ausgemessen und die Meßwerte in den Testlösungen als Bruchteil derjenigen in der vorhergehenden

Ringer-Versuchsperiode ausgedrückt. Die so erhaltenen als „relative Spannung" bezeichneten Werte stiegen unter der Einwirkung des Strophanthosids reversibel an.

Abb. 4 zeigt ein Beispiel einer Auswertung. In dem wiedergegebenen Versuch wurde eine Strophanthosidkonzentration von 0,25 γ/cm^3 verwendet. Eine erste Einwirkungsphase des Strophanthosids mit 9 Kontraktionen in 5 min zeigte eine deutliche Wirkung auf die Spannungsentwicklung in der Testlösung. Nach der zweiten Periode mit 18 Kontraktionen steigt die Spannungsentwicklung geringfügig an, deutlicher erst nach der dritten mit 27 Kontraktionen und noch etwas stärker nach der vierten mit 36 Kontraktionen. Die Zunahmen der Spannungsentwicklungen gehen im Lauf der Zeit zurück; die Wirkungen sind reversibel.

Als Maß der Strophanthosidwirkung wurde die prozentuale Zunahme der relativen Spannungen (bei der ersten Messung in der Testlösung nach Abschluß der Strophosidperiode) benützt (vgl. Abb. 5).

Resultate.

Es wurden Versuche mit Strophanthosidkonzentrationen zwischen 0,125 γ/cm^3 und 5,0 γ/cm^3 durchgeführt.

Die *Schwelle der Wirksamkeit* hängt ebenso wie die quantitative Wirkung von der Zahl der Kontraktionen während der Einwirkungszeit ab. Von 0,25 γ/cm^3 ließ sich eine Wirksamkeit bei 18 Kontraktionen noch erkennen. Von 0,125 γ/cm^3 war sie erst bei 36 Kontraktionen angedeutet und bei 72 Kontraktionen ausgesprochen.

Die *Reversibilität der Wirkung* war bei niedrigen Konzentrationen gut, wie das in Abb. 4 wiedergegebene Beispiel zeigt. Bei höheren Strophanthosidkonzentrationen war der Rückgang der Wirkung langsamer. Bis zu welchen Konzentrationen vollständiger Rückgang der Wirkung erreicht werden kann, wurde nicht systematisch geprüft.

a) Wirkung und Kontraktionszahl.

In Bezug auf die erste gestellte Frage erkennt man schon aus der oben bei der Darstellung der Methode wiedergegebenen Versuchsreihe in Abb. 4, daß die Wirkung mit der Zahl der Kontraktionen während der Einwirkungszeit zunimmt. Die Auswertung dieser Versuchsreihe ist in Abb. 5 wiedergegeben. Es zeigt sich, daß die Wirkung in diesem Versuch annähernd linear mit der Zahl der Kontraktionen steigt.

Die Kurve geht nicht durch den Nullpunkt des Koordinatensystems, was entweder durch einen Schwellenwert für die Kontraktionszahl oder durch negative Wirkungsrichtung bei sehr geringer Wirkungsintensität bedingt sein könnte, sofern die Abweichung von der Ursprungsgeraden überhaupt als signifikant betrachtet werden darf.

Leider war auf Grund einer nicht unbeträchtlichen Streuung das Resultat in vielen Versuchen nicht so eindeutig wie in dem in Abb. 5 wiedergegebenen. Die Streuung machte es nötig, große Versuchszahlen heranzuziehen, um zu signifikanten Unterschieden zu gelangen.

Eine für diesen Zweck ausreichende Zahl von Versuchen wurde nur bei der Strophanthosidkonzentration 1,0 γ/cm³ durchgeführt. Die mit dieser Konzentration gemessenen Wirkungen sind in Abb. 6 zusammengefaßt. Die Einzelbeobachtungen sind als Punkte wiedergegeben, die Mittelwerte für verschiedene Kontraktionszahlen als Kreise. Dabei sind Versuche mit nicht ganz iden-

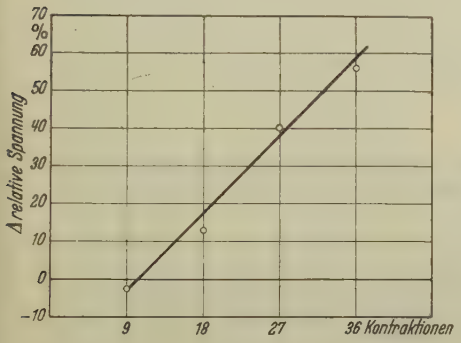


Abb. 5.

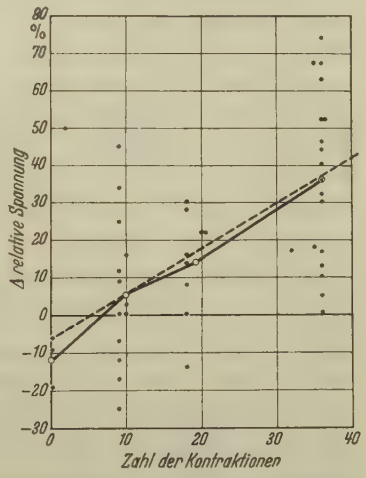


Abb. 6.

Abb. 5. Auswertung der quantitativen Strophanthosidwirkungen in dem in Abb. 4 wiedergegebenen Versuch.

Abb. 6. Zusammenstellung aller mit 1,0 γ/cm³ Strophanthosid ausgeführten Versuche. Ordinate: Wirkung; Abszisse: Zahl der Kontraktionen (während der gleichen Einwirkungszeit von 5 min). Die Punkte geben die einzelnen Meßwerte an, die Kreise die Mittelwerte für bestimmte Kontraktionszahlen, die durch gerade Linien verbunden sind. Die gestrichelte Linie ist die aus sämtlichen Beobachtungen errechnete Regressionsgerade.

tischen, aber sehr nahe beieinander liegenden Kontraktionszahlen zusammengefaßt worden, so Versuche mit 9 und mit 10 Kontraktionen, Versuche mit 18 und mit 20 Kontraktionen, Versuche mit 34, 35 und 36 Kontraktionen. Die Mittelwerte sind durch ausgezogene Geraden verbunden. Gestrichelt eingezeichnet ist die aus sämtlichen Einzelbeobachtungen ermittelte Regressionsgerade.

Es zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Wirkung von der Kontraktionszahl. Die gemessene Wirkung ist im Mittel bei 9 Kontraktionen 5,9%, bei 18 Kontraktionen 14% und bei 36 Kontraktionen 36,4%. Es besteht also gute Annäherung an Linearität. Der Verlauf der Kurve ähnelt dem in Abb. 5 wiedergegebenen Resultat aus einem Einzelversuch auch darin, daß die Regressionsgerade nicht durch den Nullpunkt geht.

Um die statistische Signifikanz der in Abb. 6 gezeigten Abhängigkeit zu prüfen, wurde auf die Unterschiede zwischen den Mittelwerten bei 9, 18 und 36 Kontraktionen der t-Test angewendet (Näheres bei Linder). Die Unterschiede erwiesen sich als signifikant, mit einem Wert von P, der für den Unterschied zwischen 36 und 18 Kontraktionen zwischen 0,05 und 0,01 und für den Unterschied zwischen 36 und 9 Kontraktionen zwischen 0,01 und 0,001 liegt.

Eine größere Anzahl von Versuchen wurde weiter mit den Konzentrationen 0,5 und 2,0 γ/cm^3 durchgeführt. Die Resultate ähnelten denjenigen in Abb. 6 qualitativ. Auf ihre Wiedergabe wird jedoch verzichtet, da die Versuchszahlen hier nicht genügend groß waren, um statistische Signifikanz zu gewährleisten. Sie sind in der Dissertation Brawand in ähnlicher Weise wiedergegeben wie diejenigen mit 1 Gamma/cc in Abb. 6. Mit den übrigen Konzentrationen wurden nur wenige Versuche zur Prüfung der Schwellenwirksamkeit und die Reversibilität durchgeführt.

Ob die bei reizfreien Einwirkungszeiten (Kontraktionszahl 0) beobachteten negativen Wirkungen als signifikant zu betrachten oder der nicht unbeträchtlichen Streuung zuzuschreiben sind, läßt sich aus den wenigen bisher zur Verfügung stehenden Versuchen noch nicht entscheiden. Die damit zusammenhängende oben gestellte Frage, worauf die Abweichung der Regressionsgeraden gegenüber einer Ursprungsgeraden zu beziehen ist, muß daher offen bleiben. Immerhin sprechen Beobachtungen bei sehr niedrigen Strophanthosidkonzentrationen, bei denen ebenfalls negative Wirkungen gefunden worden sind, für die oben erörterte Möglichkeit, daß geringste Wirkungsintensitäten zunächst zu einer Abnahme der Spannungsleistung des Herzens führen.

b) Wirkung und Konzentration.

Die zweite gestellte Frage, in welcher Weise die Wirkung quantitativ von der Strophanthosidkonzentration abhängt, konnte durch Vergleich der Wirkungen geprüft werden, die bei 36 Konzentrationen mit den Glykosidkonzentrationen 0,5, 1,0 und 2,0 γ/cm^3 erzielt wurden. Für andere Kontraktionszahlen lagen zu wenig Versuche vor, als daß ein Vergleich verschiedener Konzentrationen zu schlüssigen Resultaten hätte führen können.

Die Versuche sind in Abb. 7 wiedergegeben. Der Mittelwert für die Wirkung aus 9 Versuchen mit 0,5 γ/cm^3 beträgt 31,7%, derjenige aus 18 Versuchen mit 1,0 γ/cm^3 36,4% und derjenige aus 7 Versuchen mit 2,0 γ/cm^3 35,4%.

Die Wirkung ist demnach im Bereich zwischen 0,5 und 2,0 γ/cm^3 nur wenig von der Konzentration abhängig. Die aus sämtlichen Beobachtungen errechneten Regressionsgerade ist wiederum gestrichelt eingezeichnet (Näheres bei Linder). Sie hat fast waagrechten Verlauf. Der Regressionskoffizient (1,791) ist vom Wert 0 nicht signifikant verschieden

($P >> 0{,}05$). Dagegen ist der Unterschied gegenüber linearer Abhängigkeit zwischen Wirkung und Konzentration (im Sinne direkter Proportionalität), die einem Regressionskoeffizienten von 32 entsprechen würde, statistisch stark gesichert (P zwischen 0,01 und 0,001). Es kann also trotz der beträchtlichen Streuung so viel ausgesagt werden, daß die Wirkung der Konzentration mit Sicherheit nicht proportional ist.

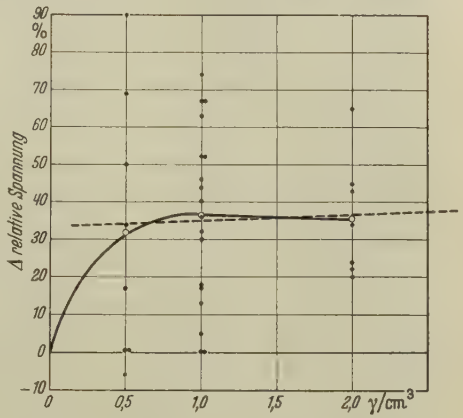


Abb. 7. Abhängigkeit der Wirkung von Strophanthosidlösungen bei einer Einwirkungszeit von 5 min und einer Kontraktionszahl von 36 in Abhängigkeit von der Konzentration. Ordinate: Wirkung. Abszisse: Konzentration. Punkte: Einzelbeobachtungen. Kreise: Mittelwerte. Die gestrichelte Gerade ist die aus den Beobachtungen bei den Konzentrationen 0,5, 1,0 und 2,0 berechnete Regressionsgerade (ohne Berücksichtigung der Tatsache, daß bei der Konzentration null die Wirkung null sein muß. Diese Tatsache ist in der eingezeichneten Kurve berücksichtigt).

Da für die Konzentration null die Wirkung auf jeden Fall null ist, wurde durch die 3 Mittelwertspunkte und den Koordinatenursprung in Abb. 7 eine Kurve gelegt. Sie ähnelt in der Form einer Sättigungskurve, wie sie z. B. für die Abhängigkeit der Fermentaktivität von der Substratkonzentration als Michaelis-Menten-Kurve bekannt ist.

Diskussion.

Die Benützung der Sensibilisierung gegenüber geringen Calciumkonzentrationen zur Beurteilung der quantitativeren Herzglykosidwirkung ist bei niedrigen Glykosidkonzentrationen befriedigend und die Schwellenkonzentration liegt relativ niedrig. Störend ist bisher die nicht unbeträchtliche Streuung.

Die nachgewiesene Abhängigkeit der Wirkung von der Kontraktionszahl bei gleicher Einwirkungszeit ist zunächst qualitativ eine Bestätigung der Weizsäckerschen Beobachtung. Durch die Heranziehung eines quantitativen und gut reversiblen Kriteriums bei 10—100mal niedrigeren Konzentrationen erhält sie jedoch größeres Gewicht.

Die Frage, ob die Bedeutung der Herztätigkeit für die Entfaltung der Glykosidwirkung in der Erregung oder in der Kontraktion begründet ist, ist zunächst nicht mit Sicherheit zu beantworten. Für einen Zusammenhang mit Erregungsvorgängen sprechen jedoch verschiedene Umstände.

Einmal liegen mehrere Beobachtungen über eine Veränderung des Elektrokardiogramms unter den Einwirkungen von Herzglykosiden vor, so von W. Trautwein, 1950, Woodbury u. Mitarb., 1951, Trautwein u. Witt, 1952.

Weiterhin sind hier aber die neueren Erkenntnisse über die Vorgänge von Bedeutung, die sich bei der Erregung im Nerven, Muskel und Herzmuskel, vermutlich aber auch in anderen Organen, abspielen.

Durch die bekannten Untersuchungen der Hodgkinschen Gruppe[4] sind wir darüber unterrichtet, daß die Vorgänge bei der Erregung und bei der Erholung des Nerven mit Ionentransporten verschiedener Art verbunden sind, so mit einem Einstrom von Natrium und einem zeitlich offenbar etwas späteren Austritt von Kalium während der Erregung und mit einer aktiven Herausbeförderung des Natriums während der Erholung durch eine in ihrem Mechanismus bisher unbekannte „Natriumpumpe", begleitet von einem vermutlich passiven Rückstrom des Kaliums.

Daß gewisse Wirkungen von Steroiden mit Ionentransporten verbunden sind, ist vor allem durch die Bedeutung der Nebennierenrindensteroide für den Elektrolythaushalt bekannt geworden. Auch für Herzglykoside liegen ähnliche Beobachtungen oder Annahmen vor. Schatzmann fand eine Beeinflussung der Ionentransporte durch die Erythrocytenmembran durch Herzglykosid. Szent Györgyi hat die Annahme gemacht, daß das Treppenphänomen bei der Herzkontraktion auf Kaliumaustritt aus der Herzmuskelfaser beruht und hat gefunden, daß es durch Herzglykoside vermindert bzw. aufgehoben wird.

Die Annahme, daß Herzglykoside irgendwie, beispielsweise als Ionenträger, mit Ionentransporten bei Erregung oder Erholung verknüpft sind, scheint danach nicht unwahrscheinlich. (Insbesondere wird bei ihrer Prüfung dem Calcium besondere Aufmerksamkeit zu schenken sein.)

Trifft sie zu, so wäre anzunehmen, daß nicht nur die Wirkung des Herzglykosids, sondern auch seine Aufnahme in die Muskelfaser von der Tätigkeit des Herzens abhängt.

Dieser Schlußfolgerung scheinen zunächst Beobachtungen zu widersprechen, die ebenfalls von Weizsäcker[2] stammen und bei denen sich ergab, daß im Gegensatz zur Wirkung des Herzglykosids seine Aufnahme in den Herzmuskel nicht von der Tätigkeit des Herzens abzuhängen scheint.

Bedauerlicherweise sind diese Untersuchungen jedoch nicht mit dem gleichen Glykosid durchgeführt worden wie die oben erwähnten (g-Strophanthin), sondern mit Digitoxin. Daß zwischen Strophanthin und Digitoxin wichtige Unterschiede bestehen, geht u. a. aus der Beobachtung von Fischer hervor, daß die Zeit bis zum Herzstillstand im Falle des Strophanthins durch Herabsetzung des Calciumgehaltes der Ringerlösung verlängert werden kann, im Falle des Digitoxins dagegen nicht. Eine Möglichkeit für die Deutung solcher Diskrepanzen liegt vielleicht darin, daß das Digitoxin schlecht wasserlöslich und besser lipoidlöslich ist, so daß ihm möglicherweise neben dem Membrandurchtritt im Rahmen von Erregungs- und Erholungsvorgängen auch die freie Diffusion durch die Lipoidmembran als Eintrittsweg zur Verfügung steht. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß auch die negativen Ergebnisse von Issekutz und von Fischer (siehe oben) bei der Nachprüfung des Weizsäckerschen Befundes auf solchen Besonderheiten des Digitoxins beruhen.

Mit der Annahme, daß Glykosidwirkung und Glykosidaufnahme eine ähnliche Abhängigkeit von der Glykosidkonzentration besitzen, würde auch die folgende Parallele in guter Übereinstimmung stehen. Die in Abb. 7 wiedergegebene Kurve zeigt ähnlichen Verlauf wie diejenige, die in einer früheren Mitteilung (Wilbrandt) für den Zusammenhang zwischen Glykosidaufnahme und Glykosidkonzentration aus der Ab-

hängigkeit der bei der biologischen Digitalistitration ermittelten Letaldosis von der Zufuhrgeschwindigkeit des Glykosids abgeleitet wurde.

Eine qualitative Prüfung der Glykosidaufnahme bei Variation der Konzentration in einem Bereich, der den vorliegenden Versuchen entspricht, liegt leider noch nicht vor. Eine solche Prüfung, die methodisch allerdings nicht unbeträchtlichen Schwierigkeiten begegnen würde, könnte für die aufgeworfenen Fragen wesentliche Aufschlüsse bringen.

Zusammenfassung.

Die Wirkung von Strophanthosid auf den isometrisch arbeitenden und elektrisch gereizten Froschventrikel wurde quantitativ untersucht. Als Kriterium wurde benützt die Erhöhung der Spannungleistung in calciumarmen Lösungen, die gegenüber anderen Kriterien den Vorteil großer Empfindlichkeit, guter Reversibilität und raschen Ansprechens besitzt.

Es wurde gezeigt, daß die Wirkung bei gleicher Einwirkungszeit des Glykosids in statistisch signifikanter Weise von der Zahl der Herzkontraktionen während der Einwirkung des Glykosids abhängt. Die Mittelwerte der Wirkungen in Versuchen mit 9, 18 und 36 Kontraktionen, verhielten sich wie 5,9:14:36,4.

Es wird angenommen, daß diese Abhängigkeit der Wirkung von der Tätigkeit des Herzens darauf zurückzuführen ist, daß das Glykosid von Bedeutung ist für Ionentransporte im Rahmen der Erregungs- und Erholungsvorgänge, möglicherweise als Ionenträger.

Die Abhängigkeit der Wirkung von der Konzentration des Glykosids ist nicht linear. Die Wirkungen bei Konzentrationen von 0,5, 1,0 und 2,0 γ/cm^3 verhielten sich wie 31,7:36,4:35,4. Da die Wirkung bei der Konzentration null ebenfalls null sein muß, scheint die Abhängigkeit der Wirkung von der Konzentration die Form einer Sättigungskurve zu besitzen. Es wird darauf hingewiesen, daß eine solche Form auch für die Abhängigkeit der Glykosidaufnahme von der Konzentration wahrscheinlich gemacht worden ist.

Literatur.

Blumenfeld, S., and O. Loewi: J. of Pharmacol. **83**, 96 (1945). – Brawand, K.: Diss. Bern 1953. – Fischer, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **130**, 194 (1928). – Hodgkin, A. L.: Biol. Rev. **26**, 339 (1951). – Issekutz, K.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **78**, 155 (1915). – Levi, B.: Diss. Bern 1953. – Linder, A.: Statistische Methoden für Naturwissenschafter, Mediziner u. Ingenieure. Basel: Birkhäuser 1954. – Loewi, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **82**, 131 (1918). – v. Muralt, A.: Einführung in die praktische Physiologie. Berlin: Springer 1944. – Schatzmann, H. J.: Unveröffentlichte Resultate. – Szent-Györgyi, A.: Bull. N. Y. Acad. Med., p. 3, January 1952. – Trautwein, W., u. P. N. Witt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 197 (1952). – Weizsäcker V.: (1), Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **72**, 282; (2) 347 (1913). – Wilbrandt, W.: Helvet. physiol. Acta **10**, 372 (1952). – Wilbrandt, W., u. J. L. de la Cuadra: Helvet. physiol. Acta **5**, 272 (1947). – Woodbury, L. A., H. H. Hecht and A. R. Christopherson: Amer. J. Physiol. **164**, 307 (1951).

Prof. Dr. W. Wilbrandt, Pharmakologisches Institut der Univ. Bern/Schweiz.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 408—419 (1953).

Department of Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts/U.S.A.

Metabolic Action of the Cardiac Glycosides III. Influence of Ouabain on the Utilization of C^{14}-Labeled Glucose, Lactate, and Pyruvate by Dog Heart Slices*.

By

Albert Wollenberger.

(Eingegangen am 14. April 1953.)

In his stimulating essay "On the Mechanism of Drug Action" Otto Loewi (1952) has devoted particular attention to those drugs which he aptly has termed "organ-specific". Discussing various ways in which drugs belonging to this class do or may alter the functions of those organs and physiological systems which exhibit a specific sensitivity to their action, he has pointed out how the functional alterations may be associated with alterations in metabolism. In the course of this discussion Loewi arrives at an interesting proposition: "From the data just reported it seems as if intermediary products of carbohydrate metabolism — the same may hold true also for protein metabolism — do not mark, so to say, functionally indifferent steps in the transit from glycogen to CO_2 but that at least some intermediary products under certain conditions may play a part also in the various specific functions of organs. Anyway, a systematic study of the correlations of intermediary metabolites to specific functions may be a promising task." The present study deals with the fate of several important metabolites in heart muscle under the influence of a heart-specific drug. It was undertaken with the ultimate purpose of furthering the understanding of the correlations between the metabolic and specific functional changes produced by this drug. In reporting on this work the author is pleased to acknowledge the benefit derived from discussions with Prof. Loewi of some of the concepts on the relationship of drug action and metabolism set forth in his essay.

The drug forming the subject of the present investigation is one of the cardiac glycosides, the action of which on the heart is an outstanding case of organ-specificity of drugs. Although the "old urgent aim" (Loewi, 1952) of elucidating the underlying mechanism of this action still remains to be realized, the progress achieved in this direction has not been insignificant. Loewi's work on the synergism of the cardiac glycosides and calcium, published 35 years ago (Loewi, 1918), may in

* Dedicated to Prof. O. Loewi on his 80th birthday.

this connection be cited as the most important single contribution to date. Information of great interest has also been derived from the study of the effects of these drugs on the metabolic processes furnishing the energy for the contraction and the other specific functions of the heart (for a review see WOLLENBERGER, 1949). The myocardium being an aerobic tissue, the emphasis in this work has been on its oxidative metabolism and on those substrates which constitute its principal fuel. Owing largely to limitations of the available methods, the measurements of metabolism were usually confined to determinations of total respiratory gas exchange or of substrate disappearance. Needless to say, such measurements afford at best only fragmentary information on the ability of a tissue to oxidize a particular substrate, especially when the endogenous metabolism, as in heart muscle, is of a high order. Except for a few studies on heart homogenates and extracts, which mainly served to demonstrate the essential role played by structural factors in the metabolic response of the undestroyed tissue to cardiac glycosides, the influence of these drugs on the oxidation of a given substrate by cardiac muscle was never made the subject of direct and quantitative investigation. The present experiments were designed as a first step in filling this gap. By the use of substrates labeled with radioactive carbon their oxidation to CO_2 was followed and correlated with their disappearance and with the total respiratory activity. The substrates chosen were glucose, lactate, and pyruvate, which together may account for the major part of the oxidative metabolism of the heart (SCHUMANN, 1950; OLSON and SCHWARTZ; TAESCHLER et al). For the sake of simplicity of experimental design and technique the experiments were conducted in the WARBURG apparatus on presumably non-contracting heart muscle in the form of slices. Part of these experiments have been reported in preliminary communications (WOLLENBERGER, 1951a; 1951b).

Methods.

Healthy adult dogs in the postabsorptive state were anesthetized with ether. The thorax was quickly opened, the heart excised, and a piece of the left ventricle removed and placed in cold isotonic salt solution. Slices of this tissue approximately 0.8 mm. thick were cut free hand with a razor blade, the cut being effected, as far as possible, in the direction of the muscle fibers. The slices were collected in a shallow dish containing a few milliliters of the salt solution serving as incubation fluid, and about 150 mg. were placed in each of the respirometer vessels used. These were vessels provided with two sidearms and containing 2.65 ml. of substrate-free modified KREBS-RINGER-phosphate solution (WOLLENBERGER, 1947) in the main compartment, 0.2 ml. substrate solution with or without cardiac glycoside in one sidearm, and 0.1 ml. 2 N HCl in the other sidearm. They were filled with oxygen and shaken at 38° C. Oxygen consumption and carbon dioxide evolution were measured as described by WARBURG and YABUSOE. Substrate and glycoside were added to the main compartment after a preliminary incubation period of 45 minutes during which the rate of respiration became constant following an initial decrease.

The experimental period was terminated by addition of the acid from the second side arm. Manometric readings were taken every 7½ minute and extrapolated to the times of adding the contents of the sidearms. The protein in the vessels was precipitated by addition of 1.0 ml. of 20% trichloroacetic acid. Aliquots of the supernatant were taken for determination of glucose (NELSON), lactic acid (BARKER and SUMMERSON), and pyruvic acid (FRIEDEMAN and HAUGEN). The amount of these compounds present at the start of the experimental period was determined in separate vessels. For determination of the glycogen content of the slices the tissue was digested in boiling 30% KOH, the glycogen precipitated with alcohol, purified, and hydolyzed, and glucose determined by the method of NELSON.

The cardiac glycoside selected for the present study was the water-soluble ouabain (g-strophanthin). The radioactive substrates were: D-glucose uniformly labeled with C^{14}, derived from starch photosynthesized in $C^{14}O_2$ and donated by Dr. R. E. OLSON; potassium pyruvate-2-C^{14}, obtained from Dr. M. L. KARNOVSKY, and sodium DL-lactate-2-C^{14}, which was prepared from the zinc salt, furnished by the U.S. Atomic Energy Commission, by percolating the salt through DOWEX 50 and neutralizing the free acid with NaOH. The radioactivity of these substrates had been determined after their conversion into $BaCO_3$ or could be estimated on this basis after correction for selfscattering. Before use the radiosubstrates were diluted with non-isotopic glucose, sodium pyruvate, and sodium lactate, respectively. The sodium pyruvate was prepared by neutralization of freshly distilled pyruvic acid with $NaHCO_3$ and precipitation in alcohol. To obtain the unlabeled lactate diluted commercial lactic acid was depolymerized by boiling and neutralized with NaOH. The total amounts of substrate used per incubation flask were: 26.1 micromoles glucose (not 16.1 micromoles, as erroneously stated earlier [WOLLENBERGER, 1951, a]); 25.8 micromoles pyruvate; or 51.5 micromoles lactate.

The oxidation of the substrates was determined from the percentage of the initial radioactivity in the incubation medium recovered in the respiratory CO_2. The alkali in the center well of the incubation flask in which the CO_2 was absorbed was transferred, with washings, to a graduated centrifuge tube, and the carbonate was precipitated as the barium salt by addition of $BaCl_2$. The $BaCO_3$ was washed with water and ethanol and finely suspended in ethanol. 0.2 ml. aliquots were transferred to and dried on stainless steel planchets for counting, and another aliquot was dried and weighed. The radioactivity of the samples was measured in the proportional flow counter. The counts were corrected for background and selfabsorption.

The experiments with glucose and with pyruvate were performed in quadruplicate with cardiac tissue from a different dog in each experiment, while the lactate experiments were carried out in duplicate using the hearts of two dogs. The metabolic changes measured have been expressed on a comparable basis as the metabolic quotient "Q", which symbol denotes microliters ideal gas (N.T.P.) appearing (+) or disappearing (—) per hour per milligram dry tissue. 1 microliter = 0.044 micromoles. The dry weight of the tissue was determined after the termination of the experiments and includes the dry weight of the slices and of the protein in the incubation medium precipitated by trichloroacetic acid. Only the mean Q values are reported.

Results.

Effects on the Utilization of Glucose. Studies on the effect of cardiac glycosides upon the consumption of glucose by the intact beating heart (GREMELS; MARDONES, LIRA and NIEMEYER) have yielded conflicting results. Table 1 shows that the rate of glucose consumption of sliced dog

heart muscle is diminished by 5×10^{-7} M ouabain. The oxidation of the glucose consumed, however, is greatly intensified by the cardiac glycoside. As can be seen from table 1, the rate of $C^{14}O_2$ production from the radioactive glucose was more than twice as high in the cardiac slices exposed to the drug than it was in the controls. Since 1 mole of glucose gives rise to 6 moles of CO_2, it can be calculated from the figures in table 1 that whereas in the controls 16.3 per cent $\left(\frac{2.97 \cdot 100}{6 \cdot 3.03}\right)$ of the glucose taken up was oxidized to CO_2, the corresponding percentage in the slices treated with ouabain was 37.7 $\left(\frac{6.08 \cdot 100}{6 \cdot 2.69}\right)$.

Table 1 shows, furthermore, that the rate of respiration of the dog heart slices incubated in glucose was increased by about 33 per cent in

Table 1. *Effect of Ouabain on the Metabolism of D-Glucose Uniformly Labeled with C^{14} by Slices of Dog Ventricular Cardiac Muscle.* Initial glucose concentration 9.2 millimolar. 120 minute incubation period

Treatment	$-Q_{glucose}$	$Q_{lactate}$	$Q_{keto\ acid}$	$Q_{C^{14}O_2}$	Q_{CO_2}	$-Q_{O_2}$
Control	3.03	1.61	0.07	2.97	7.8	8.3
$5 \cdot 10^{-7}$ M ouabain.	2.69	0.63	0.02	6.08	11.1	11.2

the presence of ouabain. The increase took place during the first fifteen minutes following addition of the drug and persisted throughout the two hour experimental period. Glucose without ouabain did not increase the rate of oxygen consumption, but prevented it from falling off toward the end of the two hours. Total CO_2 production was increased by ouabain somewhat more than was the O_2 consumption so that the respiratory quotient rose to near unity. In a few runs not included in table 1 the O_2 uptake was seen to be still elevated after four hours following addition of the ouabain. This was also the case when the concentration of the glycoside was increased to 10^{-5} moles per liter. Comparison of the differences between the $Qc^{14}o_2$ values and between the values of the Qco_2 shows that the increase in respiration caused by ouabain is quantitatively accounted for by the increase in glucose oxidation. It can further be seen from the $Qc^{14}o_2$ and Qco_2 figures that the fraction of the total respiration which was due to respiration of glucose rose from one-third to above one-half under the influence of the drug.

The results of the lactic acid determinations in table 1 show that dog heart muscle slices supplied with glucose have an appreciable aerobic glycolysis which is depressed by ouabain. The production of small amounts of pyruvic acid and possibly other keto acids is lowered correspondingly by the glycoside. In glucose without ouabain the lactate formed amounted to 26.6 per cent $\left(\frac{1.61 \cdot 100}{2 \cdot 3.03}\right)$ of the lactate equiva-

lent of the glucose consumed, while in glucose with ouabain it amounted to only 11.7 per cent $\left(\frac{0.63 \cdot 100}{2 \cdot 2.69}\right)$. The lactate formed was not isolated. However, since lactate production without added glucose was found to be nil, it is reasonable to conclude that the metabolite arose from the evenly labeled sugar and had the same radioactivity per carbon. It follows that if the lactate which failed to accumulate in ouabain solution, or its precursor (pyruvate), was oxidized to CO_2, a corresponding increase in the formation of $C^{14}O_2$ should have taken place. The decrease in lactate formation was close to one Q unit. Since combustion of 1 mole lactic acid gives rise to 3 moles CO_2, the decrease in lactate appearance should have been accompanied, in case of complete oxidation of that portion of the glucose which ouabain prevented from being transformed to lactate, by a rise in $C^{14}O_2$ production of about 3 Q units. As was already seen from table 1, this is what actually happened. It appears, therefore, that the greater part of the glucose which normally is glycolyzed by dog heart slices is, under the influence of a cardiac glycoside, oxidized to carbon dioxide.

This inference concerning the changes in glucose metabolism caused by ouabain is strengthened by the fact that the decrease in lactate accumulation was not accompanied by synthesis of glycogen. This is shown by the results given in table 2. The glycogen content of the cardiac

Table 2. *Glycogen Content of Dog Heart Slices.*

Time and Condition	Micrograms Glycogen per 100 mg.*	
	Experiment 1	Experiment 2
Immediatly before slicing	47	44
5 min. after slicing (room temperature)	173	322
10 min. of preliminary incubation	—	95
45 min. of preliminary incubation	20	22
78 min. without added substrate	—	22
78 min. in glucose	18	20
78 min. in glucose-ouabain	25	21
78 min. in pyruvate	23	27
78 min. in pyruvate-ouabain	17	22

* as glucose.

slices was determined at various stages during the treatment of the tissue, beginning shortly before the preparation of the slices. Fresh dog heart muscle contains about 675 micrograms glycogen per 100 milligrams (CHERKES and ANGARSKAYA). As table 2 shows, the glycogen of the ventricular muscle sample used had fallen to less than 50 micrograms per 100 milligrams at the time it was to be sliced. Slicing and aeration in substrate-free incubation fluid caused a rapid resynthesis of glycogen.

However, the recovery was only of short duration. During the subsequent aerobic incubation in this fluid the glycogen content of the slices fell to negligible levels. It was not significantly increased after 78 minutes of incubation in glucose, regardless of whether ouabain had been added or not. Pyruvate was likewise ineffective in raising the glycogen level.

Effect on the Utilization of Lactate. The rates of lactate uptake, of its oxidation to CO_2, and of the O_2 uptake in the presence of this substrate were all increased in the dog heart slices by 5×10^{-7} M ouabain, the increases amounting to 22, 28, and 14 per cent, respectively (table 3).

Table 3. *Effect of Ouabain on the Metabolism of* DL-*Lactate-2-*C^{14} *by Slices of Dog Ventricular Cardiac Muscle.* Initial concentration of lactate 18.1 millimolar. 57 minute incubation period.

Treatment	$-Q_{lactate}$	$-Q_{O_2}$	$Q_{C^{14}O_2}$
Control	12.2	10.3	2.13
$5 \cdot 10^{-7}$ M ouabain	14.9	11.7	2.73

The rate of lactate uptake was very high as compared to that of the oxidative metabolism. This was due presumably to the high concentration of the substrate used, 18.1 millimoles per liter. At such high concentration of lactate the non-oxidative removal of the substrate by cardiac muscle slices predominates over the oxidative removal (Miller and Olson). Moreover, racemic lactate was used. As Brin et al. have shown in heart muscle of the duck and the rat, L-and D-lactate are taken up with almost equal rapidity by slices of these tissues, but the D-isomer is oxidized only slowly, at less than one third the rate of its optical antipode. The same may be true in dog heart muscle.

Comparison of tables 1 and 3 shows that the acceleration of respiration produced by ouabain was smaller in lactate than it was in glucose. This may be attributed to the fact that lactate, in contrast to glucose, stimulated the respiration of the cardiac slices. After addition of the glycoside the rates of respiration in the two substrates were approximately equal. As in the glucose experiments the increase in respiration caused by ouabain can fully be accounted for by the increase in the oxidation of lactate to CO_2. On the assumption that the rate of oxidation of the labeled center carbon fragment of the lactate molecules was close to the average rate of oxidation of all three carbon fragments, the $Qc^{14}o_2$ values obtained may be multiplied by 3 in order to yield the Qco_2 (and the Qo_2, assuming an R. Q. of 1) due to the whole molecule. It will then be seen that in the absence of ouabain 60 per cent and in its presence 70 per cent of the total respiration can be accounted for by the oxidation of lactate to CO_2. The percentage of the substrate removed from the medium which

was oxidized by the tissue was not changed by the cardiac glycoside and amounted to 18 per cent.

Effect on the Utilization of Pyruvate. It has been reported that cardiac glycosides have no effect on the uptake of pyruvate by the isolated frog heart (MARDONES, LIRA and NIEMEYER) and do not stimulate the respiration of guinea pig heart slices incubated in this substrate (WOLLENBERGER, 1947). Table 4 shows that following addition of ouabain to dog heart muscle slices supplied with 9.1 millimolar pyruvate both the

Table 4. *Effect of Ouabain on the Metabolism of Pyruvate-2-C^{14} in Slices of Dog Ventricular Cardiac Muscle.* Initial concentration of pyruvate 9.1 millimolar. 80 minute incubation.

Treatment	$-Q_{pyruvate}$	$Q_{lactate}$	net $-Q_{pyruvate}$ [1]	$Q_{C^{14}O_2}$	Q_{CO_2}	$-Q_{O_2}$
Control	7.85	2.28	5.57	3.15	12.4	10.5
$5 \cdot 10^{-7}$ M ouabain.	7.70	2.54	5.16	2.96	12.1	10.3

[1] The endogenous $Q_{lactate}$ during the experimental period was nil.

uptake of substrate and the respiration remained unaltered. Neither were the conversion of the pyruvate to lactate nor its oxidation to CO_2 significantly changed. The rate of respiration of the slices was increased by the pyruvate to approximately the level attained in glucose and in lactate after addition of ouabain.

As can be gathered from the results in table 4, pyruvate was the main substrate oxidized by the cardiac slices. The respiratory quotient was 1.17, which is close to the R. Q. for pyruvate oxidation, 1.20. Since the speed of oxidation of the carbonyl group of pyruvic acid by cardiac muscle slices is intermediate between that of the carboxyl and the methyl groups (R. E. OLSON, personal communication), it may be assumed that, on the average, for every molecule of $C^{14}O_2$ set free approximately two unlabeled CO_2 molecules arising from the terminal carbon fragments of the carbonyl-labeled substrate were liberated. On this assumption 75 per cent of the total respiration can be accounted for by the oxidation of pyruvic acid to CO_2. Table 4 shows further that about one third of the pyruvate consumed was converted to lactate and about two thirds were converted to non-lactate products (net $-Q_{pyruvate}$). As mentioned before, endogenous lactate formation was negligible. Of the pyruvate carbon being converted to non-lactate products 57 per cent can be accounted for by decarboxylation. About 30 per cent of the pyruvate taken up remains unaccounted for.

Discussion.

The use of isotopic carbon has made it possible to demonstrate an accelerating action of the cardiac glycoside ouabain on the oxidation by dog myocardium of glucose and lactate, two of the most important

sources of energy for the heart. This action accounts readily for the simultaneous increase in respiratory activity, whereby the acceleration of oxidation, particularly of glucose, greatly exceeds, in proportion, that of the oxygen uptake. It is conceivable that under certain circumstances, for example, in the presence of threshold concentrations of a cardiac glycoside, smaller but still significant increases in the oxidation of a substrate may take place without a significant change in oxygen consumption. This possibility should be borne in mind when evaluating reports of investigations in which a stimulating effect of cardiac glycosides on cardiac oxygen consumption could not be observed.

The striking increase in glucose oxidation caused by ouabain in dog heart slices is remarkable not only on account of its magnitude, but also because of its association with a reduction in substrate consumption and in glycolysis. These probably interdependent effects — the sparing of substrate and the shift from a largely glycolytic to a largely respiratory metabolism of carbohydrate — constitute a significant improvement in the economy of cellular metabolism. The importance of the latter effect is evident when one considers that the breakdown of glucose to lactic acid makes available only between 8 and 9 per cent of the free energy which is liberated in the oxidation of the sugar to carbon dioxide and water. It is frequently stressed that in the therapy of heart failure the greatest asset of the cardiac glycosides lies in their ability to increase the efficiency of the work done by the heart, i. e. the fraction of the total energy liberated by the muscle which is converted into work. In the determination of the efficiency of cardiac work total energy liberation has as a rule been estimated from the oxygen consumption. If glycolysis, as resports to be cited below suggest, is diminished by the cardiac glycosides also in the intact, working heart, the estiminations made of the increase in cardiac efficiency accompanying the positive inotropic action of these drugs would have to be revised upward.

An inhibition of aerobic glycolysis by ouabain was observed previously by Segre (1948) in horse erythrocytes and by Werner in the stomach musculature of the guinea pig. Segre believed that this inhibition was due to a large extent to an acceleration of lactate oxidation. Werner assumed that the decrease in lactic acid production was correlated with an increase in the oxidative resynthesis of the metabolite to carbohydrate.

In the present experiments the disappearance of lactate caused by ouabain was not accompanied by increased synthesis of carbohydrate (glycogen), but by an equivalent increase in oxidation. It must be pointed out, however, that these experiments were undertaken in an environment unfavorable to glycogen synthesis (Stadie, Haugaard and Perlmutter) and that one was dealing with virtually glycogenless cardiac tissue. This fact, while symplifying the analysis of the results,

necessitates increased caution in drawing inferences with respect to the behavior of cardiac muscle under more physiological conditions.

Changes in the glycogen and lactate content of the heart suggestive of increased resynthesis of glycogen have been observed in intact animals following administration of therapeutic doses of cardiac glycosides (CHERKES and ANGARSKAYA; SCHUMANN, 1949). Unfortunately, the majority of the data in the literature on the effect of cardiac glycosides upon glycogen metabolism *in vivo* are not very useful as a basis for comparison because they are rather contradictory (cf. WOLLENBERGER, 1949).

It is generally supposed that in heart muscle and other animal tissues glucose and lactate are converted to pyruvate prior to undergoing oxidative decarboxylation. Consequently, the increase in CO_2 production from glucose and lactate caused by ouabain in dog heart slices signifies, in the first instance, that the oxidation of the pyruvate formed from these substrates is accelerated. Pyruvate added in excess quantities raises the rate of O_2 consumption of these slices to about the level attained in glucose or lactate following addition of ouabain. In this case ouabain causes no further increase in O_2 consumption and does not increase the oxidation of pyruvate. It may be inferred that the drug accelerates CO_2 production from glucose and lactate by making more pyruvate available from these precursors to the enzymes catalyzing its oxidative decarboxylation via acetyl-coenzyme A and the Krebs cycle. In order to accomplish this in solutions of lactate, an immediate pyruvate precursor, the drug must accelerate the oxidation of lactate to pyruvate, which in cardiac muscle is the rate-limiting reaction in the oxidation of lactate to CO_2 (BRIN and OLSON). With glucose as substrate, formation of pyruvate need not be accelerated if its reduction to lactate is slowed down. According to table 1 this is primarily how CO_2 formation from glucose is increased by ouabain in dog heart slices. Thus the effect of ouabain on the carbohydrate metabolism of dog heart muscle slices seems to center around pyruvate and to involve the lactic dehydrogenase system, by forcing the reversible reaction catalyzed by this enzyme,

$$\text{lactate} + \text{DPN}^* \leftrightharpoons \text{pyruvate} + \text{DPN} \cdot \text{H}_2$$

to proceed to the right**. An essentially similar conclusion appears to have been reached by SEGRE (1948) in experiments with horse erythrocytes.

From mass law considerations and from the experiments with added pyruvate it may be deduced that the effect of ouabain on the lactic dehydrogenase reaction is brought about by acceleration of the reoxidation of reduced DPN, through the flavoprotein-cytochrome oxidase electron transfer chain. According to SEGRE (1948), who envisages the

* Diphosphopyridine nucleotide.

** This action can, of course, be opposed by addition of pyruvate, als illustrated by the unchanged $Q_{lactate}$ in table 4.

cardiac glycosides in the role of hydrogen carriers, ouabain would intervene directly in one of the oxidation-reduction steps. The bulk of the available evidence (WOLLENBERGER, 1949; REITER and BARRON) does not favor SEGRE's concepts. Specifically excluded can be direct effects of cardiac glycosides or aglycones on lactic dehydrogenase (REITER and BARRON) and on the cytochrome-cytochrome oxidase system (WOLLENBERGER, 1947; HELMREICH; SEGRE, 1950; DOULL et al.). At any rate, by whatever mechanism ouabain might facilitate the oxidation of reduced DPN through the electron carrier system, the result in heart muscle respiring in glucose or lactate would be that the small amounts of pyruvate present at any time, being no longer able to compete successfully with oxygen for reduced DPN, would undergo further oxidation almost as quickly as they are formed. In brain cortex, which is one of the few tissues besides heart muscle that is known to respond to cardiac glycosides and aglycones with an increase in respiration (WOLLENBERGER, 1947; DOULL et al.), aerobic lactate formation from glucose is not inhibited by these compounds, as it is in heart muscle, but is powerfully stimulated (WEESE and WIEGAND; WOLLENBERGER, 1950). This fact may be explained on the basis of certain differences in the enzymatic make-up of the two tissues. Compared to heart muscle, brain cortex is richly endowed with the enzymes and coenzymes of glycolysis and has a high glycolytic power, while its complement of the electron transport and Krebs cycle catalysts is relatively weaker. In brain cortex supplied with glucose, therefore, a release of control mechanisms restricting the aerobic breakdown of carbohydrate — such as may be effected by the cardiac glycosides (WOLLENBERGER, 1950) — might result in such rapid formation of pyruvate that only a minor fraction of the extra metabolite formed could be taken care of by the enzymes catalyzing its oxidation to CO_2, whereas perhaps the greater part would be available as hydrogen acceptor for reduced DPN and would be reduced to lactate.

The present findings and conclusions concerning the effect of ouabain on the lactic dehydrogenase reaction in dog heart slices are of special interest in view of persistent reports in the literature (v. BLUMENCRON; GOLLWITZER-MEIER; CHERKES and MELNIKOVA; MELNIKOVA; MARDONES and ESPINOSA; MARDONES, LIRA and NIEMEYER) indicating that the consumption of lactic acid by the intact, beating heart can be accelerated by cardiac glycosides. Supplementing these reports are repeated (GOTTDENKER and ROTHBERGER; GOLLWITZER-MEIER; MELNIKOVA; NAKAMURA *et al.*), albeit not uncontradicted (RÜHL; GOODALE, HACKEL and OLSON) observations of impaired lactate utilization by the heart in failure and findings suggestive of a possible involvement of lactic dehydrogenase in myocardial failure and in the action of the cardiac glycosides, through destruction or depletion (CALDER) and preservation and repletion (GOVIER, YANZ and GRELIS; GALEONE, LEVI and SEGRE), respectively, of DPN, its coenzyme.

These data, and also the observation that administration of lactate may strengthen the beat of the heart (BOGUE, EVANS and HSU), bring

back to mind LOEWI's (1952) hypothesis, quoted at the beginning of this paper, regarding the part that metabolites may play in specific functions of organs and in the action of organ-specific drugs. They raise the question whether the functional system in the heart muscle cell which is immediatly affected by the cardiac glycosides may perhaps draw on lactate as a specific source of energy. At present this question can only be asked, but not answered. Apart from the task of identifying this cellular system, and leaving aside the controversial problem (WOLLENBERGER, 1949; SCHUMANN, 1950; OLSON and SCHWARTZ) of the causal relationship between the functional and metabolic changes occurring in the heart in failure and under the influence of cardiac glycosides, it will first of all be necessary, by means of tracer experiments, to extend the above-cited studies on the contracting and working heart to yield data on the oxidation of lactate as well as information on the metabolism of pyruvate and of carbohydrate. The results reported in the present communication should encourage such experiments.

Summary.

1. Respiring slices of dog myocardium supplied liberally with glucose uniformly labeled with C^{14} or with lactate or pyruvate labeled with C^{14} in the center carbon were exposed to 5×10^{-7} M ouabain.

2. The rate of $C^{14}O_2$ production from the radioglucose was doubled by the cardiac glycoside, although the uptake of the sugar was slowed. This acceleration of oxidation was accompanied by a corresponding reduction in the rate of glycolysis and accounted fully for the simultaneous acceleration of the respiration. The glycogen content of the slices remained unchanged at low values.

3. The uptake of the lactate, the production of $C^{14}O_2$ from this substrate, and the respiration in its presence were all accelerated by ouabain.

4. The uptake of the pyruvate, the production of $C^{14}O_2$ from this substrate, its reduction to lactate, and the respiration in its presence all remained unaffected by ouabain. The rate of respiration in pyruvate was about as high as in glucose and in lactate in the presence of ouabain.

5. The possible mechanism of the accelerating effect of ouabain on the oxidation of glucose and lactate by dog heart muscle is discussed.

This work was supported by grants from the United States Public Health Service, the Life Insurance Medical Research Fund, and the William W. Wellington Fund of Harvard University. I wish to express my sincere gratitude to Dr. ROBERT E. OLSON for a gift of glucose evenly labeled with C^{14} and for his interest, to Dr. MANFRED L. KARNOVSKY for a gift of pyruvate-2-C^{14}, to Dr. ARTHUR K. SOLOMON and his staff for the measurements of radioactivity, and to Mrs. MARION BUEHLER for assistance in the chemical analyses.

Bibliography.

Barker, S. B., and W. H. Summerson: J. Biol. Chem. **138**, 535 (1941). — v. Blumencron, W. Frh.: Klin. Wschr. **20**, 737 (1941). — Bogue, J. K., C. L. Evans and F. Y. Hsu: J. Physiol. **84**, 55 P (1935). — Brin, M., and R. E. Olson: J. Biol. Chem. **199**, 475 (1952). — Brin, M., R. E. Olson and F. J. Stare: J. Biol. Chem. **199**, 467 (1952). — Calder, R. M.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **65**, 76 (1947). — Cherkes, A. I., and M. A. Angarskaya: Farmakol. i Toksikol. **2**, 60 (1939). — Cherkes, A. I., and V. F. Melnikova: Bull. Eksper. Biol. Med. **13**, 42 (1942). — Doull, J., R. G. Herrmann, E. M. K. Geiling and K. P. Dubois: Arch. internat. pharmacodynamie **86**, 487 (1951). — Friedeman, T. E., and G. E. Haugen: J. of Biol. Chem. **147**, 415 (1943). — Galeone, F., E. Levi and G. Segre: Acta Med. Scand. **139**, 308 (1951). — Gollwitzer-Meier, K.: Pflügers Arch. **245**, 385 (1941). — Goodale, W. T., R. E. Olson and D. B. Hackel: J. Clin. Invest. **29**, 816 (1950). — Gottdenker, F., and C. J. Rothberger: Pflügers Arch. **237**, 59 (1937). — Govier, W. M., M. Yanz and M. E. Grelis: J. of Pharmacol. **88**, 373 (1946). — Gremels, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **194**, 629 (1940). — Helmreich, E.: Biochem. Z. **321**, 144 (1950). — Loewi, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **82**, 131 (1918). — In: E. S. G. Barron, Ed.: Modern Trends in Physiology and Biochemistry, p. 405. New York: Academic Press. Inc. 1952. — Mardones, J., and S. de O. Espinosa: Bol. Soc. Biol. Santiago de Chile **2**, 268 (1945). — Mardones, J., E. Lira and H. Niemeyer: Bol. Soc. Biol. Santiago de Chile **4**, 76 (1947). — Melnikova, V. F.: Bull. Eksper. Biol. Med. **13**, 47 (1942). — Miller, O. N., and R. E. Olson: J. of Biol. Chem. **199**, 457 (1952). — Nakamura, K., P. R. Saunders, J. L. Webb, H. C. Lawson and C. H. Thienes: Amer. J. Physiol. **158**, 269 (1949). — Nelson, N.: J. of Biol. Chem. **153**, 375 (1944). — Olson, R. E., and W. B. Schwartz: Medicine **30**, 21 (1951). — Reiter, M., and E. S. G. Barron: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 341 (1952). — Rühl, A.: Klin. Wschr. **13**, 1529 (1934). — Schumann, H.: Z. Kreislaufforschg. **38**, 606 (1949). — Der Muskelstoffwechsel des Herzens. Darmstadt: D. Steinkopff 1950. — Segre, G.: Arch. internat. Pharmacodynamie **75**, 227 (1948). — Bol. Soc. Ital. Biol. Sper. **26**, 939 (1950). — Stadie, W. C., N. Haugaard and M. Perlmutter: J. of Biol. Chem. **171**, 419 (1947). — Taeschler, M., C. Lombardo, A. Siegel, and R. J. Bing: Amer. J. Physiol. **171**, 772 (1952). — Warburg O., and M. Yabusoe: Biochem. Z. **146**, 380 (1924). — Weese, H., and C. Wiegand in: Medizin und Chemie (I.G. Farbenindustrie), Bd. 2, p. 148. Leverkusen 1934. — Werner, G.: Arch. internat. Pharmacodynamie **79**, 323 (1949). — Wollenberger, A.: J. of Pharmacol. **91**, 39 (1947). — Pharmacol. Reviews **1**, 311 (1949). — Fed. Proc. **9**, 326 (1950). — Science (Lancaster, Pa.) **113**, 64 (1951, a). — J. of Pharmacol. **101**, 38 (1951, b).

Dr. Albert Wollenberger, Universitets Neurofysiologiske Institut, Juliane Maries Vej 36, Copenhagen, Danmark.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219. S. 420—439 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. H. F. Häusler).

Über schraubenförmige Struktur von Arterien*.

II. Mitteilung: Pharmakologische Strukturanalyse von Hirnarterien**.

Von

E. Pichler, W. Lazarini und R. Filippi.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. März 1953.)

Die pharmakologische Prüfung der Durchströmung von Hirngefäßen am Ganztier ergibt bekanntlich keineswegs einheitliche Resultate. Bei der Analyse zeigen diese eine Abhängigkeit von den verschiedensten Umständen:

Zum Beispiel beeinflußt Adrenalin i.v. die Hirndurchblutung (A. vertebralis) je nach der angewandten Narkose im Sinne einer Steigerung oder Hemmung (Rothlin u. Taeschler). Es sind die durch Pharmaka bedingten Änderungen von Seiten der Atmung und des Gesamtkreislaufes zu berücksichtigen, da sie den lokalen Effekt vollkommen überdecken können. Von Bedeutung ist auch die jeweilige „Ausgangslage" sowie die venöse O_2-Spannung. Allgemein ist der vasomotorische Effekt an Hirngefäßen viel geringer als bei Gefäßen anderer Körpergebiete, er beträgt z. B. bei Adrenalin nur etwa $^1/_{10}$ des Effektes an den Hautarterien (M. Schneider); auch können Pharmaka auf die einzelnen Abschnitte des Gefäßbaumes (Arterien — Capillaren — Venen) verschieden wirken (vgl. Pichler, 1952).

Ein noch zu wenig untersuchter Faktor ist der der Ausgangslage. Es ist keineswegs erwiesen, daß eine amphotere Reaktionsweise auf der Erregung antagonistischer nervöser Systeme beruht. Es gibt vielmehr genug Anhaltspunkte dafür, daß die verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten des Gefäßes von jeweils wechselnden Eigentümlichkeiten der Gefäßwand selbst abhängen, seien sie nun biochemisch oder morphologisch faßbar. Dieser letzte Faktor, nämlich die Strukturabhängigkeit ist Gegenstand dieser Untersuchung. Wir wählten zur Analyse ein möglichst einfaches Modell, nämlich die Untersuchung an Hirnarterien in vitro, um aus ihrem Verhalten Rückschlüsse auf die muskuläre Struktur der Arterienwand zu erhalten. Wir prüften aber auch den Einfluß von Pharmaka, die bei der Therapie des Gefäßkopfschmerzes eine Rolle spielen, in der Erwartung, dadurch gewisse Hinweise auf dessen Pathogenese zu bekommen. Da wir mit unserer Methodik nur große und mittelgroße Gefäße bis zu einem Lumen von etwa 0,4 mm Durchmes-

* I. Mitt.: Häusler, H. F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **172**, 302 (1933).

** Herrn Hofrat Prof. Dr. Otto Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

ser erfassen konnten, können sich die Befunde natürlich nur auf diesen Bereich des Gefäßbaums beziehen.

Die früheren Vorstellungen von einer reinen Ring- und Längsstruktur der Muscularis der Arterienwand erwiesen sich auf Grund neuerer Untersuchungen als hinfällig.

Schultze konnte durch Lupenpräparation von Arterien des muskulösen Typs feststellen, daß ganz allgemein die Media eine Muskelschraube mit ganz geringem Steigungswinkel darstellt. Gänshirt berichtete 1950 ebenfalls über eine Schraubenstruktur von Hirnarterien und versuchte Zusammenhänge zwischen den einzelnen Bautypen und der funktionellen Beanspruchung herzustellen. Nun ist schon Häusler (1933) auf Grund einer pharmakologischen Analyse von Mesenterialarterien des Rindes zur Annahme einer Schraubenstruktur gekommen. Pharmakologische Untersuchungen an Rindercarotiden (Rothlin, Barbour, Katz u. a.) haben bis dahin auf die Besonderheiten der Struktur keine Rücksicht genommen, da sie nur an Gefäßstreifen erfolgten, die durch Aufschneiden von Arterienringen gewonnen wurden.

Wir legten die Methode von Häusler, der mit intakten und aufgeschnittenen Längssuspensionen und in Kettenform aneinandergereihten Arterienringen arbeitete, zugrunde und ergänzten sie durch Gefäßstreifen, die in verschiedenen Winkelgraden zur Ebene des Gefäßquerschnittes geschnitten wurden.

Methodik.

Die Arterien stammten teils von Rindern, denen sie aus äußeren Gründen nur unmittelbar nach der Schlachtung entnommen werden konnten, teils von Menschen, wobei die Zeitspanne zwischen Tod und Entnahme 5—24 Std betrug. Mitunter waren spät entnommene besser erregbar als früh entnommene, so daß eine Relation der Erregbarkeit nicht nur zum Zeitpunkt der Entnahme, sondern auch zur vorangegangenen Krankheit zu bestehen scheint*. Die herauspräparierten, von dem umgebenden Gewebe befreiten Gefäße kamen sofort in eine mit Sauerstoff gesättigte Tyrodelösung und in den Eisschrank. Die Länge der untersuchten Streifen betrug im Durchschnitt 1,5—2 cm, die Breite 2 mm. Wurden in einem Versuch — wie gewöhnlich — 3 Präparationen gleichzeitig verwendet, so wurden sie auf gleiche Länge zugeschnitten. Die Ringkettenpräparation, wobei die Ringe mit dünner Seide aneinandergehängt wurden, erfolgte so, daß die Summe des halben Umfanges der einzelnen Ringe der Länge der Streifen entsprach oder zu ihr in einem einfachen Verhältnis stand. An den Carotiden wurde zur Präparation der schrägen Streifen das Gefäßstück der Länge nach aufgeschnitten und der Winkel, in dem der gewünschte Streifen ausgeschnitten werden soll, ausgemessen. Bei den kleineren Gefäßen wurde aus dem intakten Gefäß mit einer feinen Schere ein Schraubengang geschnitten, das so eröffnete Gefäß ausgebreitet und parallel zum ersten Schnitt in 2 mm Abstand ein zweiter Schnitt geführt. Bei den kleinsten Gefäßen wurde das Gefäßrohr vorsichtig und möglichst ohne Zerrung auf eine feine Nähnadel aufgezogen und mit einer Rasierklinge unter Drehung der Nadel der gewünschte Schraubengang geschnitten. Das kleinstmögliche Lumen zur Durchführung dieser Präparation betrug etwa 0,4 mm.

* Wir danken Herrn Prof. Dr. Konschegg, Vorstand des pathologisch-anatomischen Institutes, und Herrn Prof. Dr. Werkgartner, Vorstand des gerichtlich-medizinischen Institutes der Universität Graz, sowie den Herren Tierärzten des städt. Schlachthofes für das dabei bewiesene Entgegenkommen.

Die Präparationen wurden in ein 50 cm^3 fassendes Wasserbad eingehängt, das mit Sauerstoff durchperlt wurde. Die Temperatur betrug 38—39° C (±0,1°). Die Schreibhebel wurden je nach der Stärke des untersuchten Gefäßes belastet. Die Vergrößerung betrug ungefähr 1:30. Die Präparationen hingen je nach Wandstärke ½—1 Std aus. Die Zeitmarkierung bedeutet in allen Kurven 1 min. Die Menge der zugesetzten Substanzlösungen überstieg in keinem Fall $^1/_{10}$ des Badvolumens.

Die Gefäßstreifenmethode kann nach Rothlin in qualitativer Hinsicht mehr leisten als andere Testmethoden. Er fordert eine Erregbarkeit gegenüber Adrenalin von zumindest 10^{-6}, die bei allen unseren Untersuchungen gegeben war. In quantitativer Hinsicht haben empfindlichere Testmethoden entschieden den Vorzug, auch deswegen, weil bei suspendierten Arterien die Erregbarkeit, z. B. Histamin und Adrenalin gegenüber bei wiederholter Prüfung zunimmt, worauf auch Rothlin hinweist. Quantitative Auswertungen waren zur Strukturanalyse aber in der Regel nicht erforderlich; es genügte zumeist ein Vergleich des Verhaltens von 3 in verschiedener Richtung geschnittenen Suspensionen und zwar von Ring- und Längssuspensionen entsprechend einem Steigungswinkel von 0° bzw. 90° und von einer mit 45° Steigungswinkel geschnittenen Spirale. Zur näheren Analyse wurden bei großen Gefäßen noch Streifen, die in verschiedenen Steigungswinkeln geschnitten wurden, herangezogen.

Die zugesetzten Substanzen wurden im allgemeinen in Stammlösungen in der Konzentration 1:1000 angesetzt, im Eisschrank aufbewahrt und erst zum Versuch entsprechend verdünnt. Folgende Präparate in Reinsubstanz wurden herangezogen (Endverdünnungen in Klammern):

Adrenalin bitartarticum „Sanabo“, (10^{-6}, 10^{-5}), l-Noradrenalin. bitartarticum „Sanabo“ (10^{-5}), Histamin. dihydrochloricum „Roche“ (10^{-7} — 10^{-5}), Coffeinum natr. benz. (10^{-4}, 10^{-3}), Ergotamin. tartar. „Sandoz“ (1:150000), Dihydroergotamin-methansulfonat (DHE) „Sandoz“ (1:150000), Papaverin. hydrochlor. (10^{-4}), Amylnitrit (0,5 ml einer gesättigten wäßrigen Lösung auf 50 ml Bad-Fl.), ferner Ampullen von Hydergin „Sandoz“ (1:166000) und Ampullen von nicotinsaurem Natrium „Direktan Gerot“ (1:500), schließlich Acetylcholinchlorid „Roche“ (10^{-4}, 10^{-3}).

Ergebnisse.

Unsere Versuche sind in Tab. 1 (Rind) und Tab. 2 (Mensch) zusammengefaßt.

Für die Beurteilung der Gefäßstruktur seien folgende Gesichtspunkte vorangestellt:

1. Zeigt eine unter einem bestimmten Winkel geschnittene Schraube eine stärkere Kontraktion als die anderen Streifen desselben Gefäßes, kann man mit Sicherheit auf das Überwiegen von Schraubenfasern in dieser Richtung und in diesem Winkel schließen (vgl. Abb. 1 und Tab. 3).

2. Kontrahieren sich auf ein wirksames Mittel die Gefäßringe und die flach geschnittenen Schraubenstreifen, während die Längsstreifen und Längsstücke erschlaffen, so kann man auf fast ausschließliche Ringmuskulatur schließen (Typ I der Tab. 4).

3. Kontrahieren sich alle 3 typischen Präparationen (Ringstreifen, bzw. -kette, 45°-Schraube, Längssuspension bzw. -streifen) ungefähr gleich stark, kann auf das Vorhandensein von Fasern in allen Rich-

Tabelle I. *(Rind).*

	Art. carotis communis Vers. Nr. 6, 11, 55						Art. carotis communis (dist. Stück) Vers. Nr. 5, 25						Art. occipitalis Vers. Nr. 52						Art. carotis externa Vers. Nr. 2, 3, 15, 16, 17, 18, 21, 27					
	Hist.	Adr.	Nor.	Erg.	DHE	Hyd.	Hist.	Adr.	Nor.	Erg.	DHE	Hyd.	Hist.	Adr.	Nor.	Erg.	DHE	Hyd.	Hist.	Adr.	Nor.	Erg.	DHE	Hyd.
Intaktes Längsstück																			———	(—)				
Längsstreifen (90°)	——	—	—	0			——		(—)	(—)	0	0	++	0	0	0	0	0	—				0	0
45°-Streifen							++		+	(+)	(—) (+)	(—)	+++	0		+	0	0	(+)	+			0	0
Querstreifen (0°) bzw. Ringkette	+++	+++	+++	(+)			+++		+	(+)	(+) (—)	(—)	++	+		+	—	0	+++			+	0 (—)	(—)

	Art. temporalis superf. Vers. Nr. 54, 53, 36						Art. basalis Vers. Nr. 19, 53						Art. cerebri media, Vers. Nr. 8, 9, 24						Art. cerebri anterior Vers. Nr. 20					
	Hist.	Adr.	Nor.	Erg.	DHE	Hyd.	Hist.	Adr.	Nor.	Erg.	DHE	Hyd.	Hist.	Adr.	Nor.	Erg.	DHE	Hyd.	Hist.	Adr.	Nor.	Erg.	DHE	Hyd.
Intaktes Längsstück													0	0	0 (—)				0	0	(—)	0		
Längsstreifen (90°)	———	(+)	0	(+)	0	0	+		0	(+)			++	0	(+)	0			+	0	(+)	++		
45°-Streifen	——	(+)	0	0	0	0	+++		0	(+)			+	0	(—)	0			+	0*	(+)	(+)		
Querstreifen (0°) bzw. Ringkette	+++	(+)	0	(—)	0 +	0							++	0	0 (+)	0								

* nach Ergotamin. Zeichenerklärung: (+) bis +++ = schwache bis sehr starke Kontraktion; (—) bis ——— = schwache bis starke Erschlaffung; 0 = keine Wirkung; leeres Feld = nicht untersucht.

Tabelle 2. *(Mensch).*

	Art. carotis communis Vers. Nr. 38, 41, 45, 47							Art. carotis interna Vers. Nr. 35, 46						
	Hist.	Adr.	Nor.	DHE	Erg.	Hyd.	Coff.	Hist.	Adr.	Nor.	DHE	Erg.	Hyd.	Coff.
Intaktes Längsst.														
Längsstr. (90°)	0 +	0 (+)	(+)	+	+			+	0 (+)	0	0	+	0	(+)
45°-Streifen	0 +	0 (+)	(+)	+	+			+	(+)			(+)		(+)
Ringkette								++	+	(—)	0 (+)	(+)	(—)	+
Querstr. (0°)	0 +	0 (+)	(+)	+	+									

	Art. carotis externa Vers. Nr. 37, 39, 46							Art. temporalis superficial. Vers. Nr. 39, 43, 44						
	Hist.	Adr.	Nor.	DHE	Erg.	Hyd.	Coff.	Hist.	Adr.	Nor.	DHE	Erg.	Hyd.	Coff.
Intaktes Längsst.								0 (+)	0	0	+	0 +	0	(—) (+)
Längsstr. (90°)	(+)	(+)	0	+	(+)			(+)	+	0	(+)	+		
45°-Streifen	(+)	0	0	++	0			(+)	0	0	(+)	+		
Ringkette	+	0	0	0	(+)	(—)		(+)	(+)	(—)	0	—		
Querstr. (0°)	(+)	0	0 (—)	(+)	0									

	Arteria mening. media Vers. Nr. 23, 30, 42, 48							Arteria vertebralis Vers. Nr. 43, 50						
	Hist.	Adr.	Nor.	DHE	Erg.	Hyd.	Coff.	Hist.	Adr.	Nor.	DHE	Erg.	Hyd.	Coff.
Intaktes Längsst.	(+)	(+)		(+)	+		0	0	0		(+)	+	0	(+) (—)
Längsstr. (90°)	(+)	(+)	0	(+) +	++		0							
45°-Streifen	(+)	(+)		(+)	0		0							
Ringkette	+		(+)	(+)	(—)									

Tabelle 2. *(Mensch).* (Fortsetzung.)

	Arteria basalis Vers. Nr. 10, 22, 26 28, 29, 33, 34, 43, 50							Arteria cerebri media Vers. Nr. 40						
	Hist.	Adr.	Nor.	DHE	Erg.	Hyd.	Coff.	Hist.	Adr.	Nor.	DHE	Erg.	Hyd.	Coff.
Intaktes Längsst.	0	(+) (—)	0	(+)	+	(—)	(—) (+)	(—) (+)	+	+	0	0		0
Längsstr. (90°)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+) +	0 (—)	(+)							
45°-Streifen	++	(+)	(+)	(—) bis	(+)	(—)	(+)	0	(+)	0	+	0		0
Ringkette	(+)	(+)	(—) (+) (—)	+ 0 (+)	+ (+) +	(—)	— (+) —	0	0	0	0	0		0

	Arteria cerebri anterior Vers. Nr. 32, 39							Arteria frontalis Vers. Nr. 31						
	Hist.	Adr.	Nor.	DHE	Erg.	Hyd.	Coff.	Hist.	Adr.	Nor.	DHE	Erg.	Hyd.	Coff.
Intaktes Längsst.	0		0	+			0							
Längsstr. (90°)	(+)	(+)	(+)	+	(+)		0	0	0		+	(+)	0	0
45°-Streifen	0	(+)	(+)	+			0	0	0		++	+	0	0
Ringkette	0	(+)	(+)	+			0	0	0		(+)	0	—	0

Zeichenerklärung siehe Tab. 1.

Tabelle 3. *Carotis externa (Rind).* Vers. Nr. 2, 3, 6, 17, 18, 21.

Steigungswinkel des Streifens	Hist.	Adr.	Noradr.	Ergot.	DHE	Hydergin
0° (Querstr.)	++++	++++		(+)		(—)
30°	+++		++	+		
45°	+		+		0	0
60°	(+)	(+)	(+)		0	
90° (Längsstr.)	——			(—)	0	0
120°	(—)			0		
135°	++		++	0		
150°	+++		++	+		

Zeichenerklärung siehe Tab. 1.

Tabelle 4.

Typ I	*Nur* Ringmuskulatur und flache Schrauben mit Steigungswinkel von 0°—45°		*Rind:* Carotis communis Carotis externa Äste der Car. ext. (fast ausschließlich Ringmuskulatur)
Typ II	Ring- Schrauben- Längs-	Muskeln *ohne Überwiegen* einer Komponente	*Mensch:* Carotis communis Hirnbasisarterien (Steiggs.-winkel von 45° bevorzugt).
Typ III	Ring- Schrauben- Längs-	Muskeln. Steigungswinkel **0°—45°** *überwiegt*	*Rind:* Arteria occipitalis (entspr. funkt. der menschl. Carotis interna) *Mensch:* Carotis interna Carotis externa
Typ IV	Ring- Schrauben- Längs-	Muskeln. Steigungswinkel **45°—90°** *überwiegt*	*Rind:* Intrakranielle Arterien. *Mensch:* Äste der Carotis externa, Äste der Carotis interna (fast ausschließl. steile Schraub.).

tungen (Ring-, Schrauben- und Längsmuskulatur) geschlossen werden (Typ II der Tab. 4).

4. Kontrahieren sich die Ringe und Schraubenstreifen, während die Längsstreifen und Längsstücke keine Erschlaffung, sondern eine — allerdings geringere — Kontraktion zeigen, dann sind auch steile Schraubenfasern oder Längsfasern vorhanden, jedoch mit Überwiegen der Ring- und flachen Schraubenmuskulatur (Typ III der Tab. 4).

5. Kontrahieren sich die Längssuspensionen, während die Ringketten (fast) nicht reagieren oder eventuell sogar erschlaffen, dann überwiegen die längsgerichteten Fasern (Steigungswinkel 45°—90°) (Typ IV der Tab. 4).

Eine gewisse Einschränkung erfahren diese Schlüsse durch die Tatsache, daß die einzelnen Gefäß-Gebiete bzw. -Strukturen den Pharmaka gegenüber nicht gleichmäßig empfindlich sind. Erschwerend ferner, nähmlich für die Beurteilung der Kontraktion sind besonders bei kleineren Gefäßen *rhythmische Spontanbewegungen.* Im allgemeinen kann man sagen, daß diese Bewegungen um so kleiner sind, je größer das Gefäß ist. So fand z. B. Häusler bei den größeren Mesenterialarterien des Rindes keine solchen Spontanrhythmen. Gefäßstreifen mit geringer Rhythmik reagieren besser als solche mit starker Rhythmik. Streifen, die in der Richtung, in der sie geschnitten wurden, keine nennenswerten kontraktilen Elemente aufweisen, zeigen keine Spontanrhythmen. Es gibt also die Existenz und das Ausmaß von Spontanrhythmen schon vor der pharmakologischen Prüfung

gewissermaßen einen Hinweis auf das Kontraktionsvermögen der betreffenden Präparate.

Arteria carotis communis. Beim *Rind* sind nur Ring- und flache Schrauben-, aber sicher keine Längsfasern vorhanden. Mit zunehmendem Steigungswinkel nimmt das Kontraktionsvermögen ab. Bei 45° Steigungswinkel ist es — wenn überhaupt vorhanden — schon sehr gering, bei höherem Steigungswinkel fehlt es. Die Streifen reagieren, auch wenn sie schon einige Tage alt sind, sehr gut auf Histamin, Adrenalin und Noradrenalin, jedoch kaum auf Ergotamin.

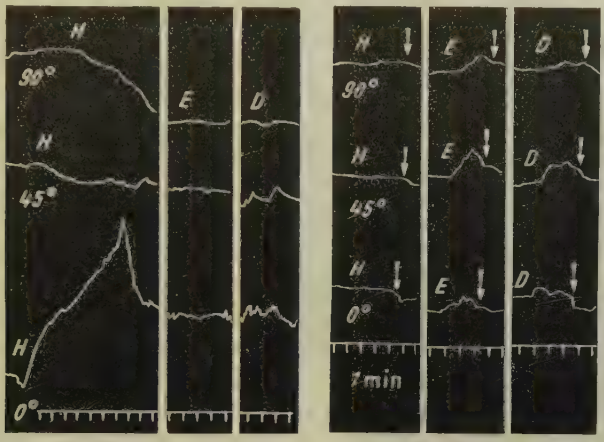


Abb. 1. a Arteria carotis communis des Rindes. Histamin (H) 10^{-6} kontrahiert nur den Querstreifen (0°), während der 45°- und 90°-Streifen erschlafft. Ergotamin (E) und DHE (D), beide 1:150000, unwirksam. b Dasselbe Gefäß vom Menschen (42 a., 10 Std p. m.). Histamin 10^{-6} und 10^{-5} wirkt nicht; auf Ergotamin und DHE in derselben Dosierung kontrahieren sich alle drei Präparationen deutlich. ↓ : Auswaschen mit Tyrode.

Beim *Menschen* lassen sich Ringe, verschieden hohe Schraubengänge und Längsfasern nachweisen. Die Kontraktionsfähigkeit ist in allen Richtungen ungefähr gleich stark und allgemein so gering, daß das Gefäß wesentlich muskelschwächer sein muß als beim Rind. Histamin, Adrenalin und Noradrenalin sind nur schwach wirksam, während Ergotamin und DHE deutliche Kontraktionen verursachen (Abb. 1).

Arteria carotis interna bzw. *A. occipitalis des Rindes**. Beim *Rind* sind Fasern in allen Richtungen vorhanden, jedoch mit deutlichem Über-

* Beim Rind ist nach Ellenberger-Baum die Carotis interna obliteriert oder nur ein ganz dünnes Gefäß. Funktionell entspricht ihr die unmittelbar benachbarte A. occipitalis, die mit der A. vertebralis und anderen Arterien ein großes Gefäßnetz an der Schädelbasis speist, von dem das Gehirn versorgt wird. Eine eigene Bezeichnung für die einzelnen Hirnarterien des Rindes gibt es nicht. Wir haben beim Rind immer solche Arterien entnommen, die nach Lage und Verlauf den definierten Arterien des Menschen entsprechen, und sie auch so bezeichnet.

wiegen der Elemente mit einem Steigungswinkel von 0—45°. Wiederum ist die Empfindlichkeit für Histamin und Adrenalin am größten.

Beim *Menschen* sind wie bei der menschlichen Carotis communis kontraktile Elemente in allen Richtungen vorhanden, jedoch tritt die Wirkung der Ringmuskeln stärker hervor. Auch die menschliche Carotis interna spricht auf Histamin besser an; etwas schwächer und ungefähr gleich stark wirken Adrenalin und Ergotamin.

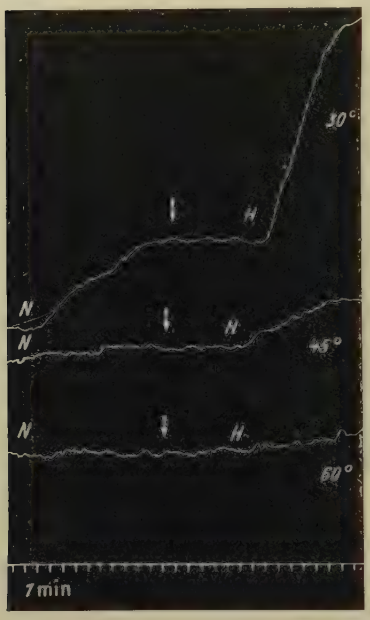


Abb. 2. Arteria carotis externa (Rind). Geringe Kontraktion des 60°-Streifens, stärkere Kontraktion des 45°-Streifens und sehr starke Kontraktion des 30°-Streifens mit Noradrenalin (N) und Histamin (H), beide in der Dosis 10^{-5}. ↓ : Auswaschen mit Tyrode.

Arteria carotis externa. Beim *Rind* sind wieder nur Ring- und flache Schraubenfasern bis einschließlich 45° Steigungswinkel vorhanden, Histamin und Adrenalin sind am stärksten wirksam (Abb. 2).

Die *menschliche* Carotis externa ist wesentlich muskelschwächer und weist die relativ stärkste Kontraktion im Bereiche der 45°-Schraube, und zwar mit DHE auf. Die daneben noch vorhandenen Ring- und Längsfasern scheinen sich ungefähr die Waage zu halten. Die Kontraktionen mit Histamin, Ergotamin und DHE sind überhaupt gering.

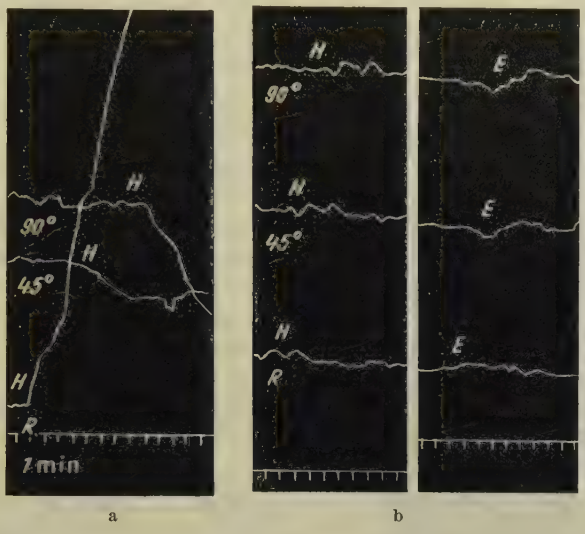
Arteria temporalis superficialis. Dieses Gefäß weist beim *Rind* eine ausschließliche Ringstruktur auf. Kontraktile Elemente fehlen auch schon in der mit 45° geschnittenen Gefäßschraube. Das Gefäß hat im Verhältnis zum Lumen eine sehr dicke Wand. Mit Histamin resultiert sehr starke Kontraktion der Ringe, während die übrigen Suspensionen erschlaffen.

Die *menschliche* Arteria temporalis superficialis hat eine viel geringere Wandstärke und zeigt nur geringe Kontraktionen aller 3 Präparationen mit deutlicher Bevorzugung der steileren Elemente (Abb. 3 u. 4).

Arteria meningica media. Beim *Menschen* kommen Fasern in allen Richtungen vor, die Längsfasern überwiegen. Ergotamin und DHE wirken relativ am stärksten.

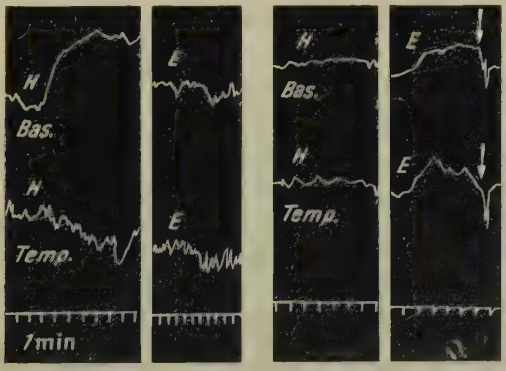
Arteria basalis (basilaris). Dieses Gefäß enthält beim *Rind* alle Fasern mit Bevorzugung der hohen Schraubengänge. Es spricht auf Histamin am stärksten an (Abb. 4).

Die *menschliche* A. basilaris hat ein größeres Lumen und eine dickere Wand als das Gefäß beim Rind. Auch hier sind Fasern aller Richtungen vertreten, größere individuelle Schwankungen kommen vor, die 45°-Suspension weist meist die stärkste Kontraktion auf. Histamin, Adrenalin



a b

Abb. 3. a Arteria temporalis superficialis (Rind). Starke Kontraktion der Ringkette, Erschlaffung der 45°—90°-Streifen durch Histamin (H) 10^{-6}. b Arteria temporalis superficialis (Mensch, 35a, 5 Std p. m.). Histamin (H) 10^{-6} praktisch unwirksam, hingegen deutliche Kontraktion der 45°- und 90°-Streifen durch Ergotamin (E) 1:150000.



a b

Abb. 4. a Intaktes Längsstück der Arteria basalis (Bas.) und der Arteria temporalis superficialis (Temp.) des Rindes. Die Basalis kontrahiert sich auf Histamin (H) 10^{-6} (Längsmuskulatur!), die Temporalis erschlafft (Ringmuskulatur!). b Dieselben Gefäße vom Menschen (35a, 5 Std p. m.). Histamin an beiden Gefäßen unwirksam, auf Ergotamin (E) 1:150000 Kontraktion beider Präparationen. (Gleichsinniges Verhalten im Gegensatz zum Rinde!) ↓ : Auswaschen mit Tyrode.

einerseits und Ergotamin, DHE andererseits sind ungefähr gleich stark wirksam (Abb. 4 und 5).

Arteria cerebri media. Beim *Rind* findet man Fasern in allen Richtungen; Längs- und Ringmuskeln sind in den entsprechenden Suspensionen gleich stark. Die etwas schwächere Kontraktion des 45°-Streifens deutet darauf hin, daß die mittelhohen Schrauben zurücktreten.

Beim *Menschen* findet sich die stärkste Kontraktion bei der intakten Längssuspension, der 45°-Streifen ist etwas schwächer, die Ringe zeigen keine Kontraktionen.

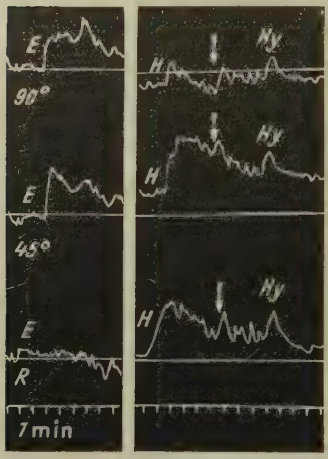


Abb. 5. Arteria basalis (basilaris), (Mensch 60 a, 11 Std p. m.). Der 90°-Streifen kontrahiert sich nur mit Ergotamin (E) 1:150000, die Ringkette (R) hingegen nur auf Histamin (H) 10^{-5}. Hydergin (Hy) 1:166000 hemmt die Spontanrhythmik. ↓: Auswaschen mit Tyrode.

Arteria cerebri anterior. Beim *Rind* überwiegen anscheinend die Längsfasern, obgleich Ringmuskelfasern noch nachweisbar sind. Auf Ergotamin erfolgt stärkere Kontraktion als auf Histamin.

Beim *Menschen* finden sich überhaupt nur sehr schwache Kontraktionen, wobei in allen Richtungen kontraktile Elemente vorhanden zu sein scheinen. Deutliche Wirkung zeigt nur DHE.

Arteria frontalis. Beim *Menschen* finden sich Fasern in allen Richtungen mit Bevorzugung des Steigungswinkels von 45—90°. DHE und Ergotamin haben deutliche Wirkung.

Besprechung der Ergebnisse.

I. Spontanrhythmen der Arterienpräparate.

Unsere Beobachtungen bezüglich der spontanen Kontraktionen der Gefäßpräparate decken sich in manchen Punkten mit denen von Rothlin, nach dem rhythmische Tonusschwankungen sehr häufig, aber nicht regelmäßig auftreten und durch große Variabilität hinsichtlich Form, Frequenz und Amplitude charakterisiert sind.

Sauerstoff und tonuserhöhende Mittel, auch Ergotamin verstärken sie oder lösen sie aus, Kohlensäure, Hydergin und andere tonusherabsetzende Mittel hemmen sie. Bezüglich ihrer Bedeutung liegt die Vermutung nahe, daß es sich um Entladungen intramuraler nervöser Elemente handelt und daß sie — wenigstens teilweise — den Ausdruck eines Ruhetonus der Gefäßwand darstellen, vergleichbar etwa im groben der Darmrhythmik oder im feinen den Entladungen des ruhenden Muskels im Elektromyogramm (Pichler u. a.). Wie weit diese Spontankontraktionen für die Verhältnisse in vivo Bedeutung haben, bleibt fraglich.

II. Pharmakologisches Verhalten der Arterienpräparate.

Bei den muskelstarken Arterien des Rindes, also Carotiden und extrakraniellen Arterien erweisen sich im allgemeinen Histamin, Adrenalin und Noradrenalin weitaus am aktivsten, während bei den muskelschwachen intrakraniellen Arterien des Rindes und Menschen und den mehr elastischen Carotiden des Menschen wohl Ergotamin und Dihydroergotamin, nicht aber Histamin und Adrenalin wirksam sind (siehe Abb. 1—5).

Histamin. Daß Histamin an isolierten Gefäßstreifen der Rindercarotiden eine Gefäßverengerung hervorruft, ist längst bekannt (Rothlin, Katz u. a.). Da die Reaktionsfähigkeit der Gefäßstreifenpräparate gegenüber Histamin von der Menge der Muskelelemente des betreffenden Gefäßes abhängt (Feldberg u. Schilf), benützten wir es in erster Linie zur Feststellung des Kontraktionsvermögens unserer Präparate. Bei Rinderarterien ist durch Histamin mit großer Sicherheit eine Kontraktion zu erzielen. Sind in einem Gefäß auch Längsmuskeln vorhanden, so wirkt das Histamin deutlich mehr auf die Ringmuskulatur. Der Effekt einer starken Kontraktion ist schwer auszuwaschen. Bei vorwiegend längsorientierter Muskulatur kleiner Arterien und vor allem bei den überhaupt sehr muskelschwachen menschlichen Kopf- und Hirnarterien ist es allerdings im Gegensatz zu Ergotamin kaum oder gar nicht wirksam.

Bei der Anwendung von Histamin am isolierten Ringgefäßstreifen muß man immer eine Kontraktion erhalten, da die Erweiterung niemals die großen Arterien, sondern die Capillaren und Arteriolen betrifft (Feldberg u. Schilf). Die Grenze zwischen erweiternder und verengernder Wirkung ist allerdings je nach Tierart verschieden. Beim Menschen nehmen an der Gefäßerweiterung zwar auch arterielle Gefäßabschnitte teil, bei unseren Untersuchungen war aber auch bei den kleinsten untersuchten Lumina von weniger als ½ mm Durchmesser niemals eine Erweiterung zu beobachten. Nach Forbes, Wolff u. Cobb werden bei der Katze alle Arterien, aber erst von einem Durchmesser von 288 μ an bis herunter zu den Kapillaren erweitert.

Nach Rigoni wird durch Histamin die Frequenz der Spontanrhythmen erhöht und ihre Amplitude vergrößert. Nach Katz können sie am Gefäßstreifen durch Histamin ausgelöst werden. Wir fanden allerdings, daß während einer starken Histaminkontraktion die Spontanrhythmen ganz oder teilweise verschwanden.

Adrenalin. Mit Adrenalin lassen sich ähnlich wie durch Histamin starke Kontraktionen bei den Präparaten aus den Rindercarotiden auslösen, allerdings nicht ganz in dem Ausmaß wie durch Histamin. Sämtliche kleineren Gefäße reagieren im Gegensatz zu Histamin nur sehr schwach. Das Kontraktionsvermögen aller Präparate vom Menschen ist sehr gering oder fehlt überhaupt ganz.

Noradrenalin. Noradrenalin kontrahiert bei den angewandten Verdünnungen im allgemeinen etwas schwächer als Adrenalin. Es wirkt ebenfalls auf die großen Gefäße stärker als auf die kleinen. Bei der A. basilaris und den Ästen der Carotis interna kann es bei erhöhtem

Tonus manchesmal zu einer Erschlaffung führen. Daß Adrenalin und Noradrenalin bei den großen Gefäßen stärker wirkt als bei den kleinen, widerspricht nicht der üblichen Auffassung ihres Angriffspunktes, da dieser ja hauptsächlich noch weiter peripher, nämlich an den Arteriolen liegt.

Acetylcholin. Acetylcholin war an unseren Präparaten unwirksam. Auf die geringe Empfindlichkeit der Hirnarterien auf Acetylcholin haben auch M. u. D. Schneider hingewiesen.

Ergotamin. An den großen Gefäßen des Rindes zeigt Ergotamin allgemein nur eine geringe Wirkung, die erheblich schwächer ist als bei Histamin und Adrenalin. Bei der Carotis externa bewirkt es am Ringstreifen bzw. an der Ringkette nur eine geringe Kontraktion, an der nicht aufgeschnittenen Längssuspension ist es wirkungslos. Die stärkste Wirkung zeigt — wie auch gegenüber Noradrenalin — der 30°-Streifen, während Histamin das Maximum der Wirkung am Ringstreifen hatte. Bei mittleren und kleineren Gefäßen des Interna- und Externagebietes, sowohl des Menschen wie auch des Rindes, ist die Wirkung viel ausgeprägter, vor allem an den längsorientierten Strukturen (Abb. 1).

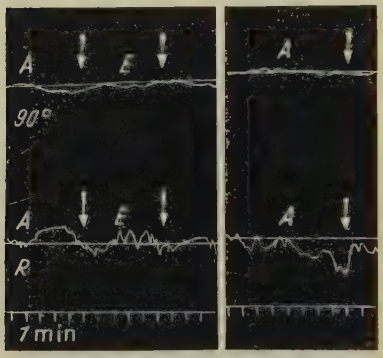


Abb. 6. Kleines Hirnbasisgefäß des Rindes (Ø 0,5 mm). Umkehr der Adrenalinwirkung (A) 10^{-8} nach Ergotamin (E) 1:150000. ↓: Auswaschen mit Tyrode.

Ergotamin bewirkt ebenso wie bei den in vitro-Versuchen von Häusler und den Hirndurchströmungsversuchen (M. u. D. Schneider) eine Umkehr oder zumindest Aufhebung der Adrenalinwirkung (Abb. 6).

Dihydroergotamin ist ebenso wie Ergotamin bei muskelschwachen mittleren und kleineren Gefäßen mit Längsstrukturen wirksam und zwar ist es — ebenso wie Ergotamin — oft das einzige überhaupt wirksame Mittel. Mitunter beobachtet man bei von vorneherein erhöhtem Tonus eine erschlaffende Wirkung.

Hydergin wirkt in der Regel entsprechend seiner den peripheren Gefäßtonus am Ganztier senkenden Wirkung erschlaffend. Es blockiert vorübergehend den Adrenalin- und (inkonstant) den Histamineffekt, jedoch nicht den Ergotamineffekt. Die Blockade des Adrenalineffektes, allerdings auch des vasokonstriktorischen Ergotamineffektes durch Hydergin ist durch Bircher u. Cerletti, sowie durch Rothlin u. Cerletti am Ganztier beschrieben. Die Spontanrhythmen hemmt es (Abb. 5), während sie durch Dihydroergotamin in der Regel gefördert werden.

Amylnitrit bewirkt deutliche Erschlaffung der Ringsuspensionen.

Papaverin bewirkt im allgemeinen bei den Rinderarterien eine langsame kontinuierliche Senkung des Tonus, die auch nach mehrmaligem Waschen fortdauert. Während der Erschlaffung, die kaum zu beheben ist, spricht das Präparat — wenn überhaupt — nur mehr auf hohe Konzentrationen von Histamin an, d. h. der Papaverineffekt ist schwer auswaschbar.

Nikotinsaures Natrium war bei unseren Untersuchungen praktisch unwirksam. Zeitweise findet sich eine minimale Erschlaffung, die kaum zu verwerten ist. Sein Angriffspunkt muß ebenso wie bei der gefäßerweiternden Wirkung des Histamins anderswo, wahrscheinlich weiter peripher liegen.

Coffein führt an der Carotis interna zu einer geringen Kontraktion. An den Gefäßen der Hirnbasis bewirkt es eine reversible Erschlaffung der Ring- und 45°-Suspension, u. zw. bei Anwendung kleiner Dosen, während große verengernd wirken. Die bekannte inkonstante Wirkung in der Gefäßperipherie, die meist durch eine Interferenz zwischen peripher erweiternder und zentral verengernder Wirkung erklärt wird, kann also auch rein peripher zustandekommen.

III. Zur Frage der Struktur der Hirnarterien.

Bezüglich der Struktur ergeben sich zwanglos die in Tab. 4 festgelegten Typen. Hierbei verdienen folgende Punkte besondere Erwähnung:

1. Die Muskelstruktur der Schädelarterien von Rind und Mensch ist *keine einfache*, sondern es finden sich immer kontraktile Elemente in mehreren Richtungen, vor allem solche in Schraubenanordnung.

Eine einfache Struktur in Form flacher Schrauben, wie sie Schultze als charakteristisch für die Arterien des muskulären Typs beschreibt, ist auf Grund unserer Untersuchungen nur bei den Carotiden und Ästen der Carotis externa des Rindes gegeben. Allerdings beschreibt er auch bei den Arterien des sogenannten muskulösen Typs feine mehr oder minder längsorientierte Muskeln, durch die die Muskelschrauben der Media verspannt werden sollen. Auch auf Grund unserer Untersuchungen scheinen diese längsorientierten Muskelelemente ebenfalls eine dynamische Funktion zu haben.

Schräge Streifen aus der Carotis externa des Rindes haben gezeigt, daß an spiegelbildlich, z. B. in einem Winkel von 30 und 150°, geschnittenen Streifen keine wesentliche Differenz festzustellen ist (Tab. 3). Diese Untersuchung wurde zur Feststellung einer ausschließlichen oder überwiegenden Rechts- bzw. Linksgängigkeit durchgeführt.

Nach Schultze steigen an den Arterien der re. Körperseite die Schrauben im Uhrzeigersinn auf, an den Arterien der li. Körperseite im entgegengesetzten Sinn. Unpaare Arterien verhalten sich wie linksgelegene Arterien.

2. Die Muscularis der Carotiden und der extrakraniellen Arterien des Rindes ist im allgemeinen viel muskelstärker als beim Menschen.

3. Beim *Rinde* haben die Carotiden Muskelelemente hauptsächlich in Ringform und in Form flacher Schrauben. Wenn man den Gefäßbaum weiter nach oben verfolgt, ergibt sich, daß die Äste der Carotis externa im wesentlichen die gleiche Struktur beibehalten. In der A. occipitalis, die funktionell der Carotis interna des Menschen entspricht, finden sich schon Fasern in allen Richtungen, jedoch mit deutlichem Überwiegen der flachen Elemente, während bei den intrakraniellen Arterien die steilen Muskelstrukturen vorwiegen; dabei nimmt anscheinend mit zunehmender Verkleinerung des Lumens der Steigungswinkel zu.

4. Beim *Menschen* ist eine viel stärkere Differenzierung gegeben: Die Carotis communis erweist sich als auffallend muskelschwach, die Strukturen sind in allen 3 Richtungen gleichmäßig vorhanden. Die Carotis externa zeigt den gleichen Bautypus, während ihre Äste durch vorwiegend hohe Schraubengänge und Längsmuskulatur ausgezeichnet sind. Die Carotis interna hat alle Elemente wie die Carotis communis, nur mit etwas stärkeren flachen Schrauben. Bei den Hirnbasisarterien überwiegt bereits der Steigungswinkel von 45°, während die Äste der Carotis interna fast ausschließlich eine Muskulatur mit einem Steigungswinkel von 45—90° aufweisen. Es kommt also — in viel ausgeprägterem Ausmaß als beim Rind — mit zunehmender Aufteilung des intrakraniellen Gefäßbaums zu einer Zunahme des Steigungswinkels.

Der Vergleich zwischen den Ergebnissen unserer Strukturanalyse und den histologischen Untersuchungen ergibt kurz folgendes:

Nach Benninghoff ist der Bautyp der Aorta des Menschen ein sogenannter elastischer Typ. Es kommen zwar zarte Ring- und Längsmuskelzüge vor, das Hauptkontingent besteht aber aus flachen Schrauben, die zu den elastischen Platten in eine besondere anatomische und — wie er meint — auch funktionelle Beziehung treten. Die Muskelfasern setzen an elastischen Elementen an und werden so zu Spannmuskeln der letzteren. Durch diese Funktionseinheit muskulärer und elastischer Elemente in Schraubenform wird der Widerstand gegen Ring- und Längsdehnungen abstufbar. Die Bedeutung der Spannmuskeln besteht darin, daß sie bei Gefäßerweiterung durch ihre Erschlaffung das elastische Gerüst zur Entfaltung freigeben, so daß kein Spannungszuwachs bei der Dehnung des Lumens entsteht. Die Spannmuskeln geben dem Windkessel eine veränderte Elastizität, durch die er sich den Schwankungen des Kreislaufes anpassen kann. Die Querschnittsänderung tritt in den Hintergrund.

Da die Carotis communis histologisch diesem Bautyp entspricht und da sie nach unseren Untersuchungen durch schwache, in allen 3 Richtungen angeordnete muskuläre Elemente ausgezeichnet ist, erscheint das vorwiegend elastische Rohr in dieser Weise (Typ II der Tab. 4) funktionell charakterisiert. Wie finden diesen Typ beim Menschen weiter distal noch im Stamm der Carotis externa und interna, hier mit etwas stärkerer Betonung der flachen Schraubengänge, ganz analog den histologischen Befunden von Gänshirt. Da beim Rind der muskuläre Charakter der Carotiden viel stärker ausgeprägt ist als beim Menschen, könnte man den muskelschwachen, vorwiegend elastischen Bautyp beim Menschen als Anpassungserscheinung an die aufrechte Haltung (rasche Weiterleitung der Blutwelle durch den Windkessel) und als Zeichen einer geringeren Beanspruchung in der Längsrichtung

auffassen. Es besteht nämlich eine Relation zwischen der longitudinalen funktionellen Beanspruchung und der Wandstruktur in dem Sinne, als bei Tieren mit langem Hals, z. B. bei der Giraffe, die Carotis bei histologischer Untersuchung besonders distal schon stark muskulös ist und auch das Rind in der Carotis viel mehr muskuläre Elemente aufweist, als der Mensch mit seinem viel kürzeren Hals. Die Muskelschraube weist beim Rind einen geringen Steigungswinkel auf; andernfalls würde sich bei Längenänderung eine starke Volumschwankung des betreffenden Gefäßabschnittes ergeben (vgl. SCHMIDT).

Das Charakteristikum der intrakraniellen Arterie ist die *steile Schraube**. Diese findet sich als vorwiegende Struktur an allen intrakraniellen Arterien des Rindes und noch stärker ausgeprägt bei den Hirnarterien des Menschen. Hier besteht insoferne gute Übereinstimmung mit den Befunden von GÄNSHIRT, als nach ihm in den Arteriolen des Gehirns der Bautyp der Spiralschraube mit großem Steigungswinkel vorherrscht. An den großen Arterien der Hirnbasis findet er allerdings nur radiäre Muskelfasern, die in querer Richtung scherengitterartig die Muscularis durchziehen; Schrauben mit longitudinalem Steigungswinkel fehlen, da sie nach seiner Meinung durch Veränderungen in der Längsrichtung zu Zerrungen der feinen in die Hirnsubstanz eindringenden Gefäßzweige führen würden. In unseren Untersuchungen waren die mit 45° Steigungswinkel geschnittenen Streifen der A. basilaris aber durchaus aktiv, ja sogar gewöhnlich aktiver als die Längs- und Ringsuspensionen.

Beziehungen zwischen der strukturellen Eigentümlichkeit der steilen Muskelschraube und ihrer Funktion. Die von außen angreifenden Kräfte, welche die Gefäße in der Längsrichtung dehnen und die nach BENNINGHOF eine starke Adventitia im Gefolge haben, fallen bei den Hirngefäßen weg. Die Adventitia, deren kollagene Fasern nach SCHMIDT in allen anderen Arterienabschnitten ebenfalls in Form gekreuzter Schrauben verlaufen, fehlt bei den Hirnarterien. Die vom Blutdruck ausgehenden Ring- und Längsdehnungen werden wie bei den Hirnarterien von der Media und der Elastica interna aufgenommen. Die Bedeutung der *Vereinfachung der Struktur* in Form der steilen Muskelschraube bestünde somit darin, daß diese die Funktion sowohl der zirkulären Muskelzüge als auch die der kollagenen, mit Ausnahme der Hirnarterien (SCHMIDT) ebenfalls schraubenförmig angeordneten Faserelemente der Adventitia übernimmt. Ein getrennter Schutzapparat gegen quer und longitudinal angreifende Kräfte ist nicht erforderlich, weil physiologisch infolge der geschützten Lage in der Schädelkapsel von außen her keine nennenswerten formverändernden Kräfte einwirken können. Die Bedeutung dieses Faktors wird z. B. an der Arteria meningica media deutlich, die sich nach ihrem Eintritt in das Schädelinnere histologisch wie eine Hirnarterie verhält.

Das wesentliche Moment ist aber wohl, daß im Gegensatz zu der vorwiegend elastischen Bauart der großen zuführenden Arterien bei dieser

* Es erscheint uns möglich, daß die steile Schraubenstruktur der Hirnarterien entwicklungsgeschichtlich bedingt ist und mit der zunehmenden Entwicklung der Großhirnhemisphären zusammenhängt.

Struktur der eigentlichen Hirnarterien weitgehend die Möglichkeit einer aktiven Lumenveränderung gegeben ist.

Nach den Untersuchungen von v. Hayek, Goertler u. Gänshirt an der A. umbilicalis und am Ductus deferens des Menschen ist eine aktive Verengerung und Erweiterung des Lumens in dieser strukturellen Einfachheit und bei relativ geringer Längenänderung der Muskelfasern nur bei dem Typ der Spiralschraube mit großem Steigungswinkel möglich. Nach Goertler kommt es unter bestimmten Voraussetzungen bei einem Steigungswinkel von über 45° zur Lumenerweiterung, bei einem Steigungswinkel von weniger als 45° zur Verengerung.

Infolge der Konfiguration dieser Schraube in Form einer Spiralschraube mit dem Ursprung an den äußersten und dem Ansatz an den innersten Schichten der Media und infolge der zum Teil sicher möglichen Verkürzung des Gefäßes kann die Kontraktion einer solchen Schraube zuerst eine Lumenerweiterung mit gleichzeitiger Längsverkürzung und Tonuszunahme der Gefäßwand und erst bei weiterer Zunahme der Kontraktion eine Verengerung des Lumens bewirken. Daß auch schon bei den relativ großkalibrigen Hirnarterien, wie wir sie untersuchen konnten, ein konstriktorisch wirkendes Mittel wie z. B. Ergotamin tatsächlich bei gleichzeitiger Verkürzung eine Gefäßerweiterung bewirken kann, haben wir beobachtet (Abb. 5).

Wenn diese Struktur trotz Gefäßerweiterung eine Tonuszunahme ermöglicht, muß sie auch bei geringer Wandstärke in der Lage sein, in einfacher Weise eine *Regulierung des Tonus* zu übernehmen. Bei Erhöhung des Blutdruckes erscheint eine kompensatorische Tonuszunahme zweckmäßig, um die Hirnarterien vor einer unnotwendigen oder gar schädlichen Füllung zu schützen. Schretzenmayr hat mit der Ganterschen Gefäßtonusbestimmung gezeigt, daß Adrenalin eine aktive Steigerung des Konstriktorentonus der Hirnarteriolen bewirkt, die aber druckpassiv überwunden wird. Die Wandstruktur mit Schrauben von verschieden hohem Steigungswinkel, die nicht nur in der Längsrichtung, sondern auch in querer Richtung, also in Form von Spiralschrauben die Wand durchsetzen, ermöglicht offenbar auch bei verschiedener Wanddehnung, daß sich jeweils ein Teil der Fasern in einem optimalen Spannungszustand befindet, daß sich also die Gefäßwand dem Gefäßinhalt immer gleichsam plastisch anschmiegt. Eine reine Ringmuskulatur dagegen könnte bei einer druckpassiven Erweiterung einen viel stärkeren Tonusverlust erleiden.

IV. Beziehungen zum Kopfschmerzproblem.

Wenn diese Einrichtung der Schraubenstruktur trotz ihrer Einfachheit unter physiologischen Bedingungen optimal zu sein scheint, kann sie offenbar unter pathologischen Bedingungen schweren Belastungen nicht gewachsen sein. Wenn der *Wandtonus* durch Störungen der Innervation oder durch Erkrankungen der Gefäßwand oder auch nur vorübergehend durch toxische Einflüsse herabgesetzt wird, ist die Gefäßwand einer starken druckpassiven Dehnung ausgesetzt. Gänshirt

(1950) konnte im Tierversuch durch Vergiftung mit Chloralhydrat sogar eine Ruptur einer A. vertebralis beobachten. Die mechanische Reizung nervöser Receptoren in der Gefäßwand durch die Pulswellen ist dann offenbar die Voraussetzung für das Zustandekommen eines Schmerzes. Man muß also grundsätzlich 2 Formen der Gefäßerweiterung unterscheiden, eine mit Tonuserschlaffung der Gefäßwand — als eine hauptsächliche Grundlage für den Gefäßkopfschmerz — und eine (wie oben besprochen) mit erhöhtem Wandtonus. In diesem Zustand kann, wie in unseren Versuchen gezeigt wurde, z. B. Noradrenalin oder DHE den Tonus senken. Aber auch Einwirkungen von außen her durch hirndrucksteigernde und sonstige pathologische Prozesse in der Nachbarschaft wird diese Struktur ihrer einfachen und daher sehr vulnerablen Mechanik wegen nicht gewachsen sein und leicht Zerrungswirkungen als Ursache von Kopfschmerzen ausgesetzt sein.

Ein wesentlicher Faktor für die Pathogenese des Gefäßkopfschmerzes scheint uns aber in der *Struktureigentümlichkeit der menschlichen Carotis externa und ihrer Äste* gegeben. Beim Rinde weist die Carotis externa und ihre Äste ebenso wie die Carotis communis im Gegensatz zu den intrakraniellen Arterien eine kräftige Ringmuskulatur und flache Muskelschrauben auf (Abb. 3a und 4a). Ein analoger Unterschied in der Wandstruktur des Carotis externa- und interna-Gebietes läßt sich auch beim Hund annehmen, bei dem Gollwitzer-Meier u. Eckardt auf Grund von Hirndurchblutungsversuchen als Ausdruck einer funktionellen Gegensätzlichkeit zwischen Carotis interna und externa einen viel stärkeren Vasokonstriktorentonus im Externa-Gebiet postuliert haben. Im Gegensatz dazu zeigen beim Menschen die Äste der Carotis externa eine muskelschwache kombinierte Struktur mit Überwiegen steil angeordneter Elemente, die weitgehend der der intrakraniellen Arterien entspricht (Abb. 3b und 4b). Dadurch ist das Externa-Gebiet allen Schädlichkeiten ausgesetzt, die eben für die intrakraniellen Arterien besprochen wurden. Dazu kommen noch auf Grund seiner ungeschützten Lage die Einwirkungen von außen und die starken Druckschwankungen, denen es im Gegensatz zu den intrakraniellen Arterien durch das Fehlen von besonderen Schutzmechanismen, Carotissinus- und anderen Gefäßreflexen voll ausgesetzt ist. Die von vielen Autoren angenommene besondere Bedeutung des Carotis externa-Gebietes für den Kopfschmerz findet hiermit auch in seiner strukturellen Eigentümlichkeit eine gute Stütze.

Aber auch aus dem *pharmakologischen Verhalten* unserer Arteriensuspensionen ergeben sich gewisse Ausblicke für das Kopfschmerzproblem. Es ist z. B. durchaus denkbar, daß die auch mit unserer Methode festgestellte Adrenalinumkehr durch Ergotamin *eine* der Grundlagen für die nicht selten vorkommenden Ergotaminversager im Migräneanfall ist (inverse Wirkung des Ergotamins bei erhöhtem Sympathicustonus?). Es fällt ferner auf, daß die mannigfaltigsten, hier untersuchten Mittel (Ergotamin, DHE, nikotinsaures Natrium, Coffein, Papaverin, Amylnitrit, Hydergin, Histamin), die sich durch ganz verschiedene und an verschiedensten Stellen des Gefäßbaumes angreifende Wirkungen auszeichnen, bei der Migräne — im Anfall oder im Intervall — therapeutisch wirksam sein können. Wenn also entgegengesetzt wirkende Pharmaka bei der Migräne an verschiedenen Abschnitten des Gefäßbaumes wirksam angreifen können, ist damit ein Hinweis für die Pathogenese in dem Sinn gegeben, daß bei der Migräne ausgedehnte Abschnitte des „Gefäßlängsschnittes" krankhaft verändert sind, und zwar nicht immer einheitlich, sondern mitunter auch in entgegengesetztem Sinn. Diese Schlußfolgerungen decken sich mit dem Ergebnis klinischer Beobachtungen (Pichler). Wenn unsere Arterienuntersuchungen in vitro in dieser Weise für das Verständnis der Pathogenese des Gefäßkopfschmerzes beitragen konnten, dürfte sich diese — zu wenig benützte — einfache Methode wahrscheinlich auch als brauchbar für andere klinische Fragestellungen erweisen.

Zusammenfassung.

1. Zur Untersuchung der muskulären Wandstruktur von Hirnarterien und der Strukturabhängigkeit von gefäßaktiven Pharmaka wurden Gefäße des Rindes und Menschen in verschiedener Weise — auch als schraubenförmig geschnittene Streifen — suspendiert und pharmakologisch geprüft.

2. Die Muskelstruktur der Arterienwand ist durch kontraktile Elemente in mehreren Richtungen, vor allem in Form rechts- und linksgängiger Schrauben ausgezeichnet. Dabei ergeben sich 4 verschiedene Bautypen: Es finden sich nur Ringmuskeln und flache Schrauben (Typ I) oder Ring-, Schrauben- (mit verschiedenem Steigungswinkel) und Längsmuskeln. Dabei überwiegt entweder keine Komponente (Typ II) oder es überwiegt der Steigungswinkel 0—45° (Typ III) oder der von 45—90° (Typ IV).

Die intrakraniellen Arterien sind beim Rinde und Menschen durch das Vorwiegen der steilen Muskelschraube ausgezeichnet, wobei der Steigungswinkel mit zunehmender Aufteilung des Gefäßbaumes zunimmt. Die extrakraniellen Arterien des Rindes sind allgemein viel muskelstärker als beim Menschen; die menschlichen Arterien zeigen eine größere Differenzierung.

3. Der wesentliche Unterschied zwischen den Arterien des Rindes und des Menschen besteht in der Wandstruktur a) der Carotis communis, die beim Rind aus einer kräftigen Ring- und flachen Schraubenmuskulatur, beim Menschen aus schwachen, in allen Richtungen verlaufenden Muskelzügen besteht, und b) der Äste der Carotis externa, die beim Rind die gleiche Bauart wie die Carotis communis, beim Menschen aber den gleichen Typus wie die intrakraniellen Arterien aufweisen.

4. Die Funktion der steilen Spiralschraube in der Wand der intrakraniellen Arterien wird nach ihrer physiologischen und pathologischen Bedeutung besprochen.

5. Bei den muskelstarken Arterien mit Ring- und flachen Schraubenmuskeln kontrahieren Histamin, Adrenalin und Noradrenalin am stärksten, während bei den muskelschwachen Gefäßen mit vorwiegend hohem Schraubengang am ehesten Ergotamin und Dihydroergotamin wirksam sind.

6. Aus den Ergebnissen werden Beziehungen zum Kopfschmerzproblem abstrahiert.

Literatur.

Barbour, H. S.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 68, 41 (1912). — Benninghoff, A.: Handb. d. mikrosk. Anat. Bd. 6. Berlin: Springer 1930. — Bircher, B., u. A. Cerletti: Helvet. med. Acta, Suppl. XXII (1919). — Ellenberger-Baum: Vergleichende Anatomie der Haustiere. Berlin: Springer 1941. — Feld-

BERG, W., u. E. SCHILF: Histamin, Monogr. aus d. Ges.-Gebiet d. Physiologie, 20. Band. Berlin: Springer 1930. — FORBES, WOLFF and COBB: Amer. J. Physiol. **69**, 266 (1929). — GÄNSHIRT, H.: Morphol. Jb. **90**, 59 (1951). — Kongreß südwestdeutscher Neurologen u. Psychiater 1950. — GOERTLER, K.: Morphol. Jb. **74**, (1934). — GOLLWITZER-MEIER, KL., u. P. ECKARDT: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **177**, 501 (1935). — v. HAYEK, H.: Z. Anat. **105**, 15 (1935). — HÄUSLER, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **172**, 302 (1933). — KATZ, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **141**, 366 (1929). — PICHLER, E.: Der Kopfschmerz. Wien: Springer 1952. — Z. Neur. **175**, 385 (1943). — RIGONI, M., zit. nach FELDBERG u. SCHILF S. 266. — ROTHLIN, E.: Biochem. Z. **111**, 218 (1920). — ROTHLIN, E., u. A. CERLETTI: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforschg **15**, 158 (1949). — ROTHLIN, E., u. M. TAESCHLER: Helvet. physiol. Acta **9**, C 37—C 39 (1951). — SCHMIDT M.: Zschr. mikr. anat. Forschg. **40**, 455 (1936). — SCHNEIDER, M.: Dtsch. Z. Nervenheilk. **162**, 113 (1950). — SCHNEIDER, M. u. D.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **175**, 640 (1934). — SCHRETZENMAYR, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **174**, 151 (1934). — SCHULTZE-Jena, B. S.: Morphol. Jb. **83**, 230 (1939).

Doz. Dr. E. PICHLER, Pharmakol. Institut der Universität Graz (Österreich).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 440—455 (1953).

Aus der 2. medizinischen Universitätsklinik (Vorstand: Prof. Dr. K. Fellinger) und dem Physiologischen Institut (Vorstand: Prof. Dr. G. Schubert) der Universität Wien.

Nebennierenrinde und Schilddrüsenfunktion*.

Von

K. Fellinger, H. Braunsteiner, H. Kolder und H. Vetter.

Mit 12 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. Januar 1953.)

Das Problem der Beziehungen zwischen Nebennierenrinde und Schilddrüsenfunktion ist noch keiner endgültigen Klärung zugeführt worden, wie die recht widersprechenden Angaben in der Literatur zeigen. Es ist begreiflich, daß diese Fragestellung derzeit wieder in den Mittelpunkt des Interesses gerückt ist, da von einer Reihe von Autoren bekanntgegeben wurde, daß mit der therapeutischen Darreichung von Cortison bzw. ACTH auch hyperthyreotische Zustände günstig beeinflußt, bzw. bei euthyreotischen Patienten hypothyreotische Zustandsbilder hervorgerufen werden können (Wolfson u. Mitarb.; Money u. Mitarb.; Berson u. Yalow). Bei Unterfunktion der Nebennierenrinde soll es häufiger als normal zum Auftreten von hyperthyreotischen Erscheinungen kommen (Frederickson; Marine u. Bauman). Aber auch hier finden sich gegensätzliche Ergebnisse. So haben Thorn u. Mitarb. eine große Zahl von Addison-Patienten mit herabgesetzter Schilddrüsenfunktion gesehen; nach Hill u. Mitarb. bewirkte Cortison bei einem M. Addison-Patienten sogar das Auftreten einer Hyperthyreose.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb versucht, an einem größeren, annähernd homogenen Tiermaterial durch eine Reihe operativer und medikamentöser Maßnahmen unter Verwendung von radioaktivem Jod der Aufklärung dieses Problems zunächst auf tierexperimentellem Wege näherzukommen.

Methodik.

Material. Zur Verfügung standen Albinoratten beiderlei Geschlechtes eines eigenen streng gezüchteten Stammes. Die Versuche erstreckten sich über ein ganzes Jahr. Nach Erreichen eines Gewichtes von etwa 150,0 g kamen die Tiere in Gruppen zu durchschnittlich fünf Tieren in den Versuch. Insgesamt wurden 132 Tiere ausgewertet.

Operative Maßnahmen. Die Hypophysektomie wurde auf paratrachealem Weg durchgeführt. Die Adrenalektomie erfolgte in einzeitiger Operation vom Rücken aus. Bei den hypophysektomierten sowie adrenalektomierten Tieren vergingen 7 Tage,

* Herrn Prof. Dr. O. Loewi verehrungsvoll gewidmet.

bei den doppelt operierten Tieren 11 Tage nach der Hypophysektomie und 4 Tage nach der Adrenalektomie bis zur Injektion des radioaktiven Jods. Alle Tiere wurden autoptisch auf Vollständigkeit der Operation bzw. auf Vorhandensein von Regeneraten untersucht; die Ergebnisse an nicht einwandfrei operierten Tieren wurden verworfen.

Medikamentöse Maßnahmen. DCA (Percorten Ciba) wurde in öliger Lösung, Cortison (Cortone Merck) in Kristallsuspension durch 7 Tage vor der Injektion des Radiojods in Dosen von 1 und 5 mg intramuskulär gegeben. Die „stress"-Tiere erhielten durch 7 Tage — mit Unterbrechung am 4. und 2. Tag vor der Radiojodinjektion — 0,3 ml Terpentin s. c.

Diät. Allen Tieren wurde durch 8 Tage vor der Radiojodinjektion eine praktisch jodfreie Diät, bestehend aus 15 g $CaCl_2$, 10 g Album. ovi, 5 g NaCl, 2 g Brauereihefe und 380 g Körnern, gegeben. Die adrenalektomierten Tiere erhielten nach der Operation als Trinkflüssigkeit 1%ige Kochsalzlösung ad libitum.

Radioaktives Jod. 24 Std vor der Tötung wurde den Tieren rund 10 μC „carrierfree" J^{131} (AERE-Einheiten) intraperitoneal injiziert. Die Tötung erfolgte in Äthernarkose nach Öffnung des Thorax und Entfernung eines Lungenflügels durch Ausbluten in den heparinisierten Thoraxraum. Die Schilddrüsen wurden durch alkoholische Natronlauge bei 60° in 12 Std liquifiziert. Die Radioaktivität dieser Lösung bzw. des Plasmas wurde in einem Flüssigkeitszählrohr (Veall) mit der Aktivität einer Standardlösung, die aus einem aliquoten Anteil der ursprünglichen J^{131}-Lösung bestand, verglichen und in Prozent der Aktivität der Standardlösung angegeben. Gezählt wurden mindestens 10000 Impulse, so daß der Zählfehler nicht mehr als $\pm$ 1% betrug.

Statistische Methoden. Die Prüfung auf Signifikanz der Unterschiede zwischen den Durchschnittswerten der einzelnen Gruppen wurde mit dem t-Test nach Student-Fisher vorgenommen und eine Signifikanz konventionsgemäß dann angenommen, wenn die Gegenwahrscheinlichkeit P (nach den Tafeln von Fisher und Yates) kleiner als 5% war. Die Korrelationsrechnung und die Prüfung auf Signifikanz des Korrelationskoeffizienten wurden ebenfalls nach den von Fisher angegebenen Regeln durchgeführt.

Ergebnisse.

a) Normaltiere.

Die Funktion der Schilddrüse unterliegt bei normalen Ratten starken Schwankungen. Dies ist nicht nur in der großen Variabilität des Schilddrüsengewichtes in seinem Verhältnis zum Körpergewicht und in der Verschiedenheit des histologisch erkennbaren Funktionszustandes (mittlere Zellhöhe des Funktionsepithels) begründet, sondern offenbar auch in kaum faßbaren Differenzen im hormonellen Gleichgewicht des endokrinen Haushaltes der Schilddrüse und der sie beeinflussenden Organe. Aus der Betrachtung der Größe des mittleren Fehlers der Mittelwerte, wie sie in Tab. 1 angegeben sind, werden diese Schwankungen ersichtlich.

Ihre Größe zwang dazu, die Wirkungen jeder einzelnen operativen oder medikamentösen Maßnahme mit den Ergebnissen an jeweils neuen, gleichzeitig angesetzten Gruppen von Normaltieren zu vergleichen. So stehen uns für die Auswertung der Versuchsergebnisse an Normaltieren neun Gruppen mit insgesamt 46 Tieren zur Verfügung. Dies ergab die

Tabelle 1.

Gruppe	Anzahl	KG	SD	SDI	NN	NNI	JA_{SDI}	PG_{KG}
1	6	129,2 ± 6,41	18,7 ± 1,09	14,5 ± 0,78	32,7 ± 2,25	25,1 ± 1,03	44,5 ± 5,13	3,19 ± 0,358
2	5	108,7 ± 3,27	10,9 ± 1,12	10,0 ± 0,33	38,3 ± 2,51	35,4 ± 1,88	45,7 ± 6,08	4,37 ± 0,361
3	5	164,5 ± 8,01	24,7 ± 1,40	15,3 ± 1,27	29,1 ± 1,64	17,9 ± 1,30	29,5 ± 2,15	2,90 ± 0,318
4	6	147,5 ± 4,34	23,3 ± 1,15	15,9 ± 0,81	37,2 ± 2,34	25,3 ± 1,68	31,3 ± 1,30	2,51 ± 0,381
5	4	165,0 ± 7,35	16,4 ± 1,00	9,9 ± 0,55	40,2 ± 1,83	24,4 ± 1,22	53,8 ± 2,72	3,39 ± 0,237
6	5	167,5 ± 7,71	21,6 ± 1,79	13,2 ± 1,16	40,4 ± 1,97	24,9 ± 1,32	39,4 ± 5,64	1,74 ± 0,502
7	5	126,0 ± 4,72	15,0 ± 1,23	11,9 ± 0,49	30,4 ± 2,14	24,2 ± 0,95	37,9 ± 5,47	3,42 ± 0,298
8	4	133,8 ± 7,35	18,5 ± 1,47	13,8 ± 0,56	35,9 ± 2,26	27,0 ± 1,26	27,4 ± 4,36	2,65 ± 0,426
9	6	152,8 ± 5,60	19,1 ± 1,04	12,6 ± 0,91	34,4 ± 2,13	22,5 ± 1,45	42,6 ± 2,45	3,28 ± 0,456

Möglichkeit, einige der bisher von anderen Autoren geübten Berechnungsverfahren auf ihre Berechtigung zu prüfen und jenes zu ermitteln, das den größten Aufschluß über den Funktionszustand der Schilddrüse ergab.

Wir haben der in vitro-Technik der Radiojodfunktionsprobe den Vorzug gegeben, da sie nicht nur erlaubt, unter exakten geometrischen Bedingungen zu arbeiten, sondern vor allem die Berücksichtigung des Schilddrüsengewichtes ermöglicht. Der Nachteil der Nichtberücksichtigung der Größe der Schilddrüse, wie sie die in vivo-Technik zwangsweise mit sich bringt, überwiegt bei weitem den Vorzug, eine Reihe von zeitlich aufeinanderfolgenden Messungen an einem Tier durchführen zu können. Einige bisher veröffentlichte Versuchsergebnisse mit der in vivo-Technik sind durch diesen Umstand offensichtlich entwertet worden.

Es ergibt sich die Frage, in welcher Form das Schilddrüsengewicht und das Körpergewicht in die Berechnung des Funktionszustandes der Schilddrüse einzubeziehen sind. Es war von vornherein anzunehmen, daß normale Tiere mit größerem Körpergewicht auch größere Schilddrüsen bzw. Nebennieren besitzen würden. Die Zusammenstellung der Gewichtsbestimmung der 46 Normaltiere ergab für beide Größen eindeutig positive Korrelationen, die sich allerdings als nicht so straff erwiesen, wie man hätte annehmen können. Aus diesen Berechnungen ergaben sich zwei Indices, die das Schilddrüsen- bzw. Nebennierengewicht auf das Körpergewicht beziehen:

$$SDI = \frac{SD \cdot 100}{KG} \cdot 1000,$$

wobei KG das Körpergewicht, SD das Schilddrüsengewicht und SDI den Schilddrüsenindex bezeichnen sollen. In gleicher Weise gilt für den Nebennierenindex:

$$NNI = \frac{NN \cdot 100}{KG} \cdot 1000,$$

wobei NN das Nebennierengewicht und NNI

den Nebennierenindex bezeichnen. Der Faktor 1000 in beiden Formeln ist durch die Umrechnung der Milligramm der Organgewichte auf die Gramm des Körpergewichtes bedingt.

Die Berechnung des Funktionszustandes der Schilddrüse ergibt sich aus ihrem Verhalten gegenüber parenteral zugeführtem radioaktivem Jod. Dieses wird im Verlauf von 24 Std, soweit es nicht im Harn ausgeschieden wird, in Form von organischem Jod in der Schilddrüse gebunden, bzw. in an Eiweiß gebundener Form wieder an die Blutbahn abgegeben. Eine erhöhte Bindung von Radiojod bedeutet eine gesteigerte, eine verminderte Bindung eine herabgesetzte Schilddrüsentätigkeit. Es wird die Radioaktivität der Schilddrüse gemessen und in Prozent der angewendeten Dosis ausgedrückt. Diese Größe ist unabhängig vom Gewicht der Schilddrüse und vom Körpergewicht und läßt sich mit jener vergleichen, die man erhält, wenn man sich der in vivo-Technik durch Aktivitätsmessung über der in situ belassenen Schilddrüse bedient.

Es ist anzunehmen, daß eine größere Schilddrüse auch eine größere Menge Radiojod binden wird. Es ist daher, wenn man Aufschluß über die Funktion der Gewichtseinheit erhalten will, notwendig, das Gewicht der Schilddrüse in die Berechnung einzubeziehen:

$$JA_{SD} = \frac{JA \cdot 10}{SD},$$

wobei JA die von der SD-Lösung abgegebenen Impulse pro Zeiteinheit, ausgedrückt in Prozenten der von der Standardlösung abgegebenen Impulse pro Zeiteinheit, bezeichnen soll.

Die Aufnahmefähigkeit der Schilddrüse oder, was in diesem Fall bei festgelegter Zeit das gleiche ist, die „clearance" des Blutes von Radiojod ist jedoch weiterhin abhängig vom Körpergewicht, und es erhebt sich die Frage, ob nicht auch dieses in Form des SDI in die Formel einzubeziehen ist. Diese würde dann folgendermaßen aussehen:

$$JA_{SDI} = \frac{JA \cdot 10}{SDI},$$

Um die Berechtigung der Anwendung dieser Formel zu prüfen, haben wir die JA-Werte der 46 Normaltiere einmal dem SD und einmal dem SDI gegenübergestellt. Es ergab sich eindeutig, daß die (positive) Korrelation zwischen JA und SDI straffer ist (Abb. 1), und wir haben daher diese Formel allen unseren Berechnungen zugrunde gelegt.

Die Interpretation der so erhaltenen Ergebnisse muß jedoch folgende Einschränkung berücksichtigen: die Schilddrüse besteht sowohl aus Funktions- als auch aus Bindegewebe, und Veränderungen ihres Gewichtes können durch Zu- oder Abnahme nur eines dieser beiden Anteile verursacht werden. Ähnliche Verhältnisse können sich auch bei Beurteilung der Veränderungen des Körpergewichtes finden. Ein richtiges Bild der

Funktionsänderungen der Schilddrüse wird daher nur dann zu erhalten sein, wenn man sämtliche Ergebnisse, die durch Heranziehung der verschiedenen Formeln zustandekommen, bei der Interpretation berücksichtigt.

Der Radiojodgehalt des Plasmas besteht 24 Std nach der Applikation beim normalen Tier zum weitaus größten Teil aus organisch gebundenem Jod (Chaikoff u. Taurog). Das Meßergebnis vermittelt das prozentuelle Verhältnis des in der Volumeinheit Plasma enthaltenen Radiojods zum Radiojodgehalt der Standardlösung. Seine Höhe wird zur Größe des Plasmavolumens verkehrt proportional sein, der anorganische

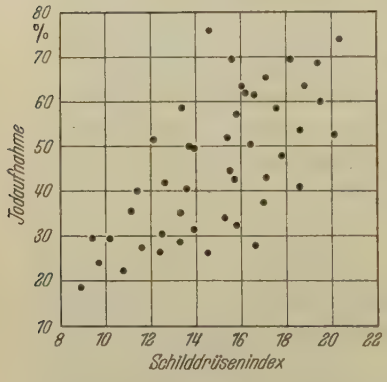


Abb. 1.

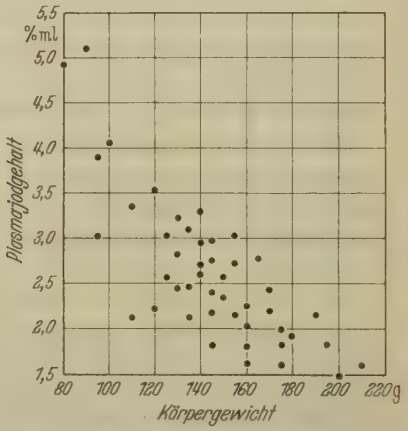


Abb. 2.

Abb. 1. Korrelation zwischen der J^{131}-Speicherung in der Schilddrüse und dem Schilddrüsenindex, d. i. Schilddrüsengewicht, bezogen auf das Körpergewicht. Die Werte stammen von 46 Normaltieren, die, in Kontrollgruppen aufgeteilt, zum Vergleich mit den behandelten Tiergruppen dienten. Der Korrelationskoeffizient ist signifikant positiv.

Abb. 2. Korrelation zwischen dem J^{131}-Gehalt des Plasmas und dem Körpergewicht der gleichen Normaltiere wie in Abb. 1. Der Korrelationskoeffizient ist signifikant negativ.

Teil des Radiojods außerdem noch durch die Gewebeflüssigkeit verdünnt werden. In erster Näherung sind diese Größen dem *KG* proportional, so daß wir, um diesen Einfluß beim Vergleich verschiedengewichtiger Tiere auszuschalten, folgende Formel benutzt haben:

$$PG_{KG} = \frac{PG \cdot KG}{100},$$

wobei *PG* die von 1 ml Plasma abgegebenen Impulse pro Zeiteinheit, ausgedrückt in Prozent der von 1 ml der Standardlösung abgegebenen Impulse pro Zeiteinheit, bezeichnen sollen.

Die Berechtigung dieser Formel ergibt sich wieder aus der negativen, signifikant straffen Korrelation zwischen Plasmagehalt und Körpergewicht der 46 Normaltiere (Abb. 2).

b) Die Wirkung der Hypophysektomie.

Die Auswirkungen der Hypophysektomie auf den Radiojodgehalt der Schilddrüse und des Plasmas sind seit den Arbeiten Chaikoffs u. Mitarb. bekannt. Der Mangel an thyreotropem Hormon setzt die Jodspeicherung der Schilddrüse stark herab und beeinträchtigt außerdem den Umbau in Thyroxin, bzw. dessen Bindung an Eiweiß und die Abgabe an das Blut. Dementsprechend enthält das Plasma fast nur anorganisches Jod, dessen Gesamtaktivität jedoch höher ist als jene bei Normaltieren. Die Verminderung der Jodaufnahme in der Schilddrüse ist nicht nur durch die Abnahme der Funktionsgewebe bedingt, sondern dieses speichert auch pro Gewichtseinheit wesentlich geringere Mengen J^{131}.

Die von uns erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 3 graphisch dargestellt. In dieser, wie auch in allen

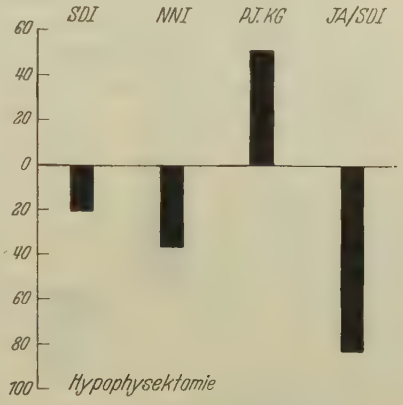


Abb. 3. Die Wirkung der Hypophysektomie auf Normaltiere. Gemessen wurden der Schilddrüsenindex (SDI), der Nebenniereninder (NNI), der J^{131}-Gehalt des Plasmas, bezogen auf das Körpergewicht (PJ_{KG}) und die J^{131}-Speicherung in der Schilddrüse, bezogen auf den Schilddrüsenindex (JA_{SDI}). Die Werte der Kontrollgruppe wurden gleich 0 gesetzt und die Wirkung der Hypophysektomie in Prozent Abweichung von den Kontrollwerten ausgedrückt. Alle Abweichungen sind signifikant.

späteren Abbildungen sind die Abweichungen der Ergebnisse an der jeweils behandelten oder operierten Gruppe in Prozenten Erhöhung oder Verminderung gegenüber den Ergebnissen der Kontrollgruppe dargestellt. Alle Veränderungen an den hypophysektomierten Tieren sind gegenüber der Normalgruppe signifikant. *SDI* und *NNI* sowie die Jodaufnahme in Bezug auf den *SDI* sind stark herabgesetzt, der Jodgehalt des Plasmas in Bezug auf das *KG* ist bedeutend erhöht. Auch die Absolutzahlen sind in guter Übereinstimmung mit den von Chaikoff angegebenen 24 Std-Werten, so daß wir die Ergebnisse dieser Versuche gleichzeitig als Test auf die Verläßlichkeit unserer Arbeitsmethode auffassen konnten.

c) Die Wirkung der Scheinhypophysektomie.

Der Frage, ob der operative Vorgang der paratrachealen Hypophysektomie eine Beeinflussung der Schilddrüsenfunktion bedingt, ist mit Ausnahme einer vor kurzem publizierten Untersuchung von Albert, der sich der in vivo-Methode bediente, noch nicht auf den Grund gegangen worden. Albert hat keine Funktionsbeeinträchtigung gefunden.

Wir haben die Operation bis zur Anbohrung des Sphenoids durchgeführt, jedoch die Hypophyse in situ belassen. Der Vergleich mit einer gleichgroßen Gruppe von Normaltieren ergab folgendes:

Unter den ermittelten Veränderungen ist die einzig signifikante jene des SDI. Die absoluten Speicherungswerte der Schilddrüse bleiben praktisch gleich, während

es durch die Erhöhung des Schilddrüsengewichtes bei geringer Herabsetzung des Körpergewichtes zu einer insignifikanten Erniedrigung von JA_{SD} und JA_{SDI} kommt. Diese Abnahme der Speicherfähigkeit ist keine echte, sondern wahrscheinlich auf eine reaktive Zunahme des Schilddrüsenbindegewebes zurückzuführen. Somit führt die Scheinhypophysektomie zu keiner eindeutigen Beeinträchtigung der Schilddrüsenfunktion und ihre Herabsetzung durch die Hypophysektomie ist zur Gänze auf den Ausfall des thyreotropen Hormons zurückzuführen.

d) Die Wirkung der Adrenalektomie.

Die adrenalektomierten Tiere, die sich zur Zeit der Radiojodinjektion bereits in einem beträchtlichen Insuffizienzzustand befanden, zeigten gegenüber einer gleichgroßen Kontrollgruppe keine signifikante Veränderung des *SDI*, während der Jodgehalt des Plasmas eindeutig höher und jener der Schilddrüse eindeutig niedriger lag (Abb. 4, jeweils linke Balken).

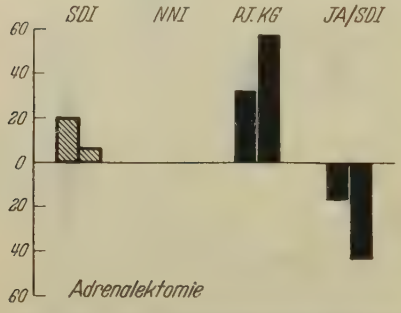


Abb. 4. Die Wirkung der Adrenalektomie auf Normaltiere. Gleiche Darstellung wie in Abb. 3. Die jeweils linken Balken sind das Ergebnis des ersten Versuches, die jeweils rechten Balken jenes des zweiten Versuches. Die Werte beider Kontrollgruppen wurden gleich 0 gesetzt. Die vollen Balken bedeuten signifikante, die schraffierten Balken insignifikante Abweichungen von den Kontrollwerten.

Dieses Ergebnis ist insofern bemerkenswert, als es wohl die Resultate von Hill u. Mitarb. an Addison-Kranken bestätigt, jedoch in scharfem Gegensatz zu den Ergebnissen der Tierversuche von Verzar u. Vidovic steht, die mit einer — in der Auswertung allerdings fraglichen — in vivo-Technik über eine Erhöhung der Schilddrüsenspeicherfähigkeit nach der Adrenalektomie zu berichten wissen.

Wir haben deshalb den Versuch unter den gleichen Bedingungen wie das erste Mal wiederholt und sind, wie in Abb. 4 durch die jeweils rechten Balken dargestellt, sogar zu noch eindeutigeren Ergebnissen gekommen. In beiden Versuchen hat die Adrenalektomie eine signifikante Herabsetzung sowohl der absoluten Speicherwerte, als auch der in Beziehung zum Schilddrüsengewicht und zum *SDI* gesetzten Werte bewirkt. Der Plasmajodgehalt wurde eindeutig erhöht, was zumindest zum großen Teil auf eine Verminderung des Plasmavolumens zurückgeführt werden muß.

e) Die Wirkung der Adrenalektomie auf das hypophysektomierte Tier.

Durch die vorstehenden Ergebnisse war außer Zweifel gestellt, daß die Anschauung, die Nebennierenrinde übe normalerweise durch die Steroide unter allen Umständen eine bremsende Wirkung auf die Ausschüttung von thyreotropem Hormon aus dem Vorderlappen aus, zumindest bei

den von uns verwendeten Versuchstieren, nicht zutreffend ist. Es blieb noch zu klären, ob der Ausfall der Nebenniere auch bei fehlender Hypophyse zu einer gleichartigen Herabsetzung der Schilddrüsenspeicherfähigkeit führt. Einer Kontrollgruppe wurde eine Gruppe hypophysektomierter Tiere, die wenige Tage später auch adrenalektomiert worden waren, gegenübergestellt. In Abb. 5 sind die Abweichungen der doppeltoperierten Gruppe von der nur hypophysektomierten Gruppe, deren Werte gleich Null gesetzt wurden, dargestellt.

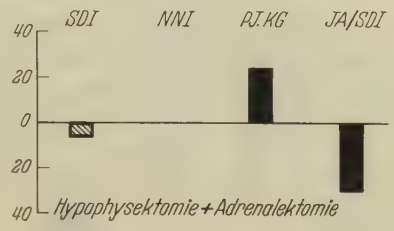


Abb. 5. Die Wirkung der Adrenalektomie auf hypophysektomierte Tiere. Gleiche Darstellung wie in Abb. 3. Die Werte einer hypophysektomierten Kontrollgruppe wurden gleich 0 gesetzt.

Es ergab sich, daß die hypophysektomierten Tiere hinsichtlich ihres Plasmajodgehaltes und ihrer Speicherfähigkeit durch die Adrenalektomie weitere gleichsinnige Veränderungen wie die Normaltiere zeigten. Hypophysektomie und Adrenalektomie wirken, wenn man von den Veränderungen des Schilddrüsengewichtes selbst absieht, in gleichem Sinne: beide zusammen rufen stärkere Effekte hervor als eine Einzeloperation. Unter diesen Bedingungen halten wir es deshalb für wahrscheinlich, daß die Nebennierenrinde auch einen direkten Einfluß auf die Funktion der Schilddrüse haben kann.

f) Die Wirkung des Desoxycorticosterons.

Desoxycorticosteron (Percorten — CIBA) wurde in Dosen von 1 bzw. 5 mg verabreicht (linke bzw. rechte Balken in Abb. 6). Beide Dosen riefen gleichsinnige Veränderungen hervor. Der Schilddrüsenindex wurde beträchtlich vergrößert, da das Gewicht der Schilddrüse noch stärker als das Körpergewicht zunahm. Die Nebenniere erfuhr erst bei täglich

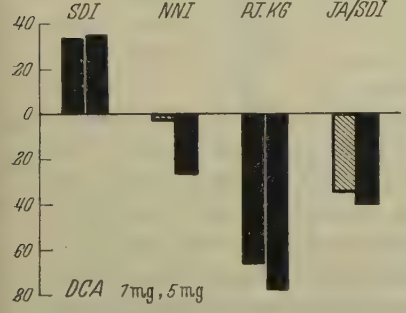


Abb. 6. Die Wirkung der DCA-Behandlung auf Normaltiere. Gleiche Darstellung wie in Abb. 3. Die jeweils linken Balken sind das Ergebnis des 1 mg-Versuches, die jeweils rechten Balken jenes des 5 mg-Versuches.

5 mg eine eindeutige Verkleinerung, ebenso die Jodspeicherung in bezug auf den Schilddrüsenindex. Allerdings zeigt sich diese nicht in den Absolutwerten, sondern kommt erst durch die Erhöhung des Schilddrüsengewichtes rechnungsmäßig zustande. Führt man diese Gewichtszunahme

auf das Auftreten eines durch DCA bedingten Ödems zurück, so ergibt sich, daß DCA die Funktion der Schilddrüse nicht beeinträchtigt. Die Abnahme der Plasmajodkonzentration könnte durch die Vermehrung des Plasmavolumens und vielleicht eine erhöhte Ausscheidungsfähigkeit der Niere für anorganisches Jod zu erklären sein.

g) Die Wirkung des 11-dehydro-17-oxycorticosteron.

Cortison (Cortone — Merck) wurde in gleicher Weise wie DCA in Dosen zu 1 und 5 mg injiziert. Die Ergebnisse des Vergleiches mit einer gleich großen Kontrollgruppe sind in Abb. 7 dargestellt. Wir fanden bei 1 mg keine, bei 5 mg eine gleiche, mäßige Verringerung des Körper- und

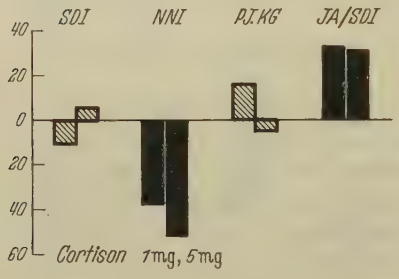


Abb. 7.

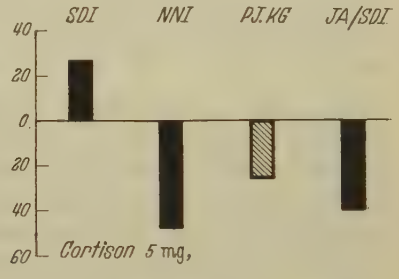


Abb. 8.

Abb. 7. Die Wirkung der Cortisonbehandlung auf Normaltiere. Gleiche Darstellung wie in Abb. 3. Die jeweils linken Balken sind das Ergebnis des 1 mg-Versuches, die jeweils rechten Balken jenes des 5 mg-Versuches.

Abb. 8. Die Wirkung der Cortisonbehandlung auf Normaltiere. Gleiche Darstellung wie in Abb. 3. Wiederholung des 5 mg-Versuches von Abb. 7.

Schilddrüsengewichtes, wahrscheinlich durch die negative Stickstoffbilanz bedingt, so daß der Schilddrüsenindex praktisch unverändert blieb. Die Nebenniere wurde bei beiden Dosierungen deutlich kleiner. Die Plasmajodkonzentration änderte sich nur im Rahmen der Fehlerbreite. Dagegen fand sich eine eindeutige Erhöhung der Speicherfähigkeit der Schilddrüse nach allen 3 Berechnungsarten.

Dieses letzte Ergebnis war außerordentlich überraschend und stand im Widerspruch zu den bisher veröffentlichten und mit ähnlichen Methoden erhaltenen Resultaten. Wir haben daher den 5 mg-Versuch wiederholt (Abb. 8). Diesmal wurde das Körpergewicht ohne gleichzeitige Verminderung des Schilddrüsengewichtes herabgesetzt, so daß eine Erhöhung des Schilddrüsenindex resultierte. In vollkommenem Gegensatz zum ersten Versuch ergab sich das zweite Mal eine signifikante Herabsetzung der Jodspeicherung. Somit ergaben zwei unter gleichen Bedingungen durchgeführte Versuche genau entgegengesetzte Ergebnisse, eine Diskrepanz, auf die in der Diskussion noch zurückzukommen sein wird.

h) Die Wirkung eines „stress".

Die Wirkung der Terpentinabscesse auf die Tiere war so stark, daß am 4. und 2. Tag vor der Radiojodinjektion die Terpentininjektionen ausgelassen werden mußten. Ein ausreichender „stress" war somit gegeben, der auch zu einer starken Hyperplasie der Nebenniere führte (Abb. 9), während sowohl Körper- als auch Schilddrüsengewicht in mäßigem Ausmaß abnahmen, so daß eine Veränderung des Schilddrüsenindex nicht zustande kam. Die Plasmajodkonzentration stieg an, während die Speicherfähigkeit der Schilddrüse stark abnahm, wie dies schon nach Formalin-„stress" festgestellt wurde (Paschkis u. Mitarb).

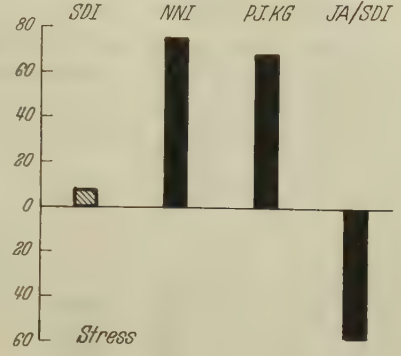


Abb. 9. Die Wirkung eines Terpentin-„stress" auf Normaltiere. Gleiche Darstellung wie in Abb. 3.

i) Die Wirkung des Cortison auf das hypophysektomierte Tier.

5 mg Cortison wurden täglich einer Gruppe von hypophysektomierten Tieren durch 7 Tage injiziert und seine Wirkung mit einer unbehandelten Kontrollgruppe hypophysektomierter Tiere verglichen (Abb. 10). Weiter lief eine Gruppe normaler Tiere mit. Weder der Schilddrüsenindex noch der Nebennierenindex änderten sich signifikant. Der Jodstoffwechsel wurde in einer der Wirkung der Hypophysektomie entgegengesetzten Weise beeinflußt. So sank die Plasmakonzentration wieder annähernd auf den Durchschnittswert der Normaltiere, während die Jodspeicherung anstieg, aber nicht den Durchschnittswert der Normaltiere erreichte. Somit liegt auch hier eine Situation vor, in der Cortison in der Lage ist, die Speicherfähigkeit der Schilddrüse eindeutig zu erhöhen.

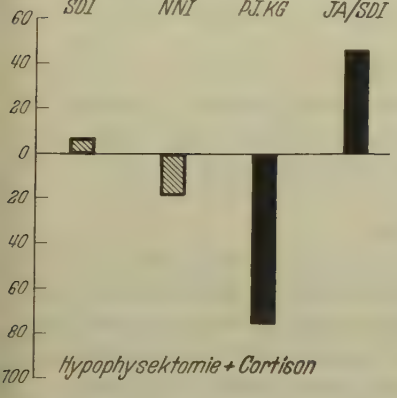


Abb. 10. Die Wirkung einer Cortisonbehandlung auf hypophysektomierte Tiere. Gleiche Darstellung wie in Abb. 3. Die Werte einer hypophysektomierten Kontrollgruppe wurden gleich 0 gesetzt.

j) Die Wirkung des Cortison auf das adrenalektomierte Tier.

Ein Gruppe adrenalektomierter Tiere erhielt täglich 5 mg Cortison, eine Gruppe adrenalektomierter Tiere und eine Gruppe normaler Tiere

wurden mitgeführt (Abb. 11). Die Veränderungen des Schilddrüsenindex waren insignifikant. Cortison konnte die Steigerung der Plasmajodkonzentration, die durch die Adrenalektomie hervorgerufen worden war, zum großen Teil wieder aufheben. Die Speicherfähigkeit der Schilddrüse sank dagegen weiter in signifikantem Ausmaß ab.

k) Die Wirkung des Cortison auf das „gestresste" Tier.

Wurden die mit Terpentininjektionen „gestressten" Tiere zusätzlich noch mit täglich 5 mg Cortison behandelt, so wurden mit Ausnahme des Schilddrüsenindex, der sich nur wenig änderte, die Wirkung des „stress" durch Cortison stark vermindert. Der Unterschied in der Speicherfähig-

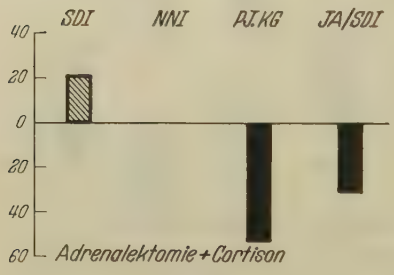


Abb. 11.

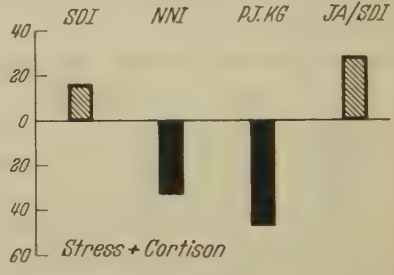


Abb. 12.

Abb. 11. Die Wirkung einer Cortisonbehandlung auf adrenalektomierte Tiere. Gleiche Darstellung wie in Abb. 3. Die Werte einer adrenalektomierten Kontrollgruppe wurden gleich 0 gesetzt.

Abb. 12. Die Wirkung einer Cortisonbehandlung auf „gestresste" Tiere. Gleiche Darstellung wie in Abb. 3. Die Werte einer terpentin-„gestressten" Kontrollgruppe wurden gleich 0 gesetzt.

keit der Schilddrüse zwischen beiden Gruppen ist infolge der großen Streuung der „stress"-Wirkung nicht eindeutig, doch liegt er so nahe der Signifikanzgrenze, daß uns hier eine weitere Situation gegeben erscheint, in der Cortison die Speicherfähigkeit der Schilddrüse erhöhen kann.

Diskussion.

Es besteht kein Zweifel, daß in manchen Punkten das klinische Bild der Unterfunktion der Schilddrüse jenem der Nebennierenrindenschwäche gleicht. Es hat daher auch nicht an Stimmen gefehlt, die einerseits diese beiden Erscheinungsformen auf eine gemeinsame Ursache zurückführen wollten — wie es z. B. eine plurihormonelle Schwäche des HVL wäre — oder andererseits versuchten, die Beziehungen zwischen beiden Organen in einem synergistischen Sinne zu deuten. Jedoch hat unter Nichtberücksichtigung dieser klinischen Erfahrung in den letzten Jahren eine Anschauung Boden gewonnen, die auf der bekannten Tatsache der bremsenden Wirkung gewisser Steroide auf die Ausschüttung von thyreotropem Hormon aufbaut. Die Ergebnisse der Untersuchungen, die durch die klinischen Anwendungen des Cortison möglich geworden waren,

schienen darauf hinzudeuten, daß dieses Steroid als einer der wichtigsten Vertreter der Nebennierenrinde tatsächlich imstande sei, eine Unterfunktion der Schilddrüse herbeizuführen. Für diese Theorie spräche ferner, daß Money u. Mitarb. auch mit anderen Steroiden die Jodspeicherung der Schilddrüse herabsetzen konnten. Eine analoge Wirkung wurde dem adrenocorticotropen Hormon nachgewiesen, so daß der Ausdruck „corticogener Hypothyreoidismus" nicht ohne Berechtigung erschien.

Eine aufmerksame Lektüre von bisher veröffentlichten Berichten läßt zwar keinen Zweifel darüber, daß Cortison in hohen Dosen in den meisten Fällen eine Herabsetzung der Jodspeicherung in der Schilddrüse bewirkt hat, läßt jedoch auch erkennen, daß dies offenbar nicht immer der Fall ist. Charakteristisch ist in dieser Beziehung die Arbeit von Perry, der wohl in einem Versuch eine Herabsetzung der Jodspeicherung gesehen hat, jedoch in einem zweiten Versuch sogar eine geringe Erhöhung derselben bemerken mußte. Gleichwohl wird dieser Umstand im zusammenfassenden Abschluß übergangen. Hill u. Mitarb. konnten bei Addison-Kranken feststellen, daß Cortison anfänglich eine Steigerung der Jodspeicherung bewirkte, um erst nach prolongierter Applikation diese endgültig herabzumindern. Versucht man endlich, die Durchschnittshöhe des Funktionsepithels als Maß für die Tätigkeit der Schilddrüse zu nehmen, so sieht man, daß Cortison sie nicht nur nicht vermindert, sondern sie sogar bei hypophysenlosen, mit TSH behandelten Tieren vergrößert (Halmi).

Somit sind unsere Versuchsergebnisse, soweit sie die Cortisonwirkung betreffen, nicht ganz so überraschend, wie sie im ersten Moment erscheinen. Es gibt anscheinend Bedingungen, unter denen Cortison nicht seine gewohnte, die Schilddrüsentätigkeit erschwerende Funktion ausübt. Zu diesen gehört offenbar jene des hypophysenlosen Tieres. Dieser Befund würde der Theorie von der bremsenden Wirkung des Cortison auf die Hormonsekretion des Vorderlappens nicht widersprechen, denn ohne Hypophyse käme diese Wirkung ja nicht zustande. Dagegen kann mit dieser Theorie das Versagen der Cortisonhemmung, wie wir es auch bei normalen Tieren gesehen haben, nicht in Übereinstimmung gebracht werden. Endlich haben wir auch beim „gestressten" Tier einen Anstieg der durch den „stress" verminderten Speicherfähigkeit gesehen.

Die Beeinträchtigung der Jodspeicherung durch „stressors" verschiedenster Art — sie ist nicht für Terpentin spezifisch, kann daher nicht auf dessen chemische Wirkung zurückgeführt werden — wurde bisher recht einfach dahingehend erklärt, daß der „stress" zu einer vermehrten Produktion von Rindensteroiden führt und diese über den Hypophysenvorderlappen die Thyreoidea beeinflussen (Paschkis u. Mitarb.). Unsere Ergebnisse stellen diese Hypothese in Frage, da mit ihr kaum erklärt werden kann, warum eine weitere Zufuhr von Cortison im „stress"-Zustand die Jodspeicherfähigkeit wieder erhöht.

Es wäre zu erwägen, ob nicht schon ein vermehrter ACTH-Gehalt des Blutes genügt, den Hypophysenvorderlappen zur Einschränkung seiner TSH-Produktion zu veranlassen. Tatsächlich setzt parenteral verab-

reichtes ACTH auch beim adrenalektomierten Tier die Jodspeicherung der Schilddrüse herab (Soffer u. Mitarb.), womit nachgewiesen ist, daß diese Wirkung ihren Weg nicht über die Nebennierenrinde nimmt. Parenteral verabreichtes Cortison würde dann beim „gestressten" Tier die ACTH-Produktion zurückdrängen und an deren Stelle wieder eine vermehrte TSH-Ausschüttung treten, die in der Schilddrüse eine vermehrte Aufnahme von radioaktivem Jod bedingt. Unvereinbar mit dieser Anschauung bleibt allerdings die Tatsache, daß Cortison auch beim hypophysektomierten Tier die Jodspeicherung erhöht.

Wie in allen endokrinologischen Experimenten sollte auch in dieser Frage das Ergebnis des Gegenversuches die Beantwortung ermöglichen. Wie beeinflußt der Ausfall der endogenen Steroidproduktion der Nebennierenrinde die Schilddrüsentätigkeit? Soffer u. Mitarb. haben keinen Unterschied zwischen der Jodaufnahme in der Schilddrüse normaler und adrenalektomierter Ratten finden können, allerdings wurden die adrenalektomierten Tiere mit DCA behandelt und waren somit nicht in einem Insuffizienzzustand. Wir fanden in 2 völlig getrennten Versuchen mit absoluter Eindeutigkeit, daß die Adrenalektomie eine beträchtliche Herabsetzung der Jodspeicherfähigkeit der Schilddrüse bewirkte, was mit den Ergebnissen von Keating u. Mitarb. an Addison-Kranken in guter Übereinstimmung steht. Selbst das Fehlen der Hypophyse konnte an dieser Wirkung nichts ändern. Somit spricht auch das Ergebnis dieser Gegenversuche nicht für die Anschauung, daß Nebenniere und Schilddrüse einander in antagonistischem Sinne gegenüberstehen würden.

Desoxycorticosteron hat in einem Versuch die Jodspeicherung der Schilddrüse kaum beeinflussen können. Auch die Herabsetzung der Speicherung, die Money nach DCA-Gaben gesehen hat, kam nur bei Einbeziehung des Schilddrüsenindex zustande, dessen Erhöhung aber wahrscheinlich auf die starke Gewichtszunahme des Schilddrüsengewebes infolge Wasseraufnahme zurückzuführen war. Somit konnten wir die Ergebnisse Verzars, die so gut mit seiner Theorie von der alleinigen Repräsentanz der Nebennierenrinde durch Desoxycorticosteron übereinstimmen würden, in keiner Weise bestätigen. Weder hat in unseren Versuchen die Adrenalektomie die Schilddrüsenfunktion erhöhen, noch DCA sie erniedrigen können.

Die Bestimmung der Jodkonzentration des Plasmas hat uns bei der Deutung unserer Ergebnisse nur wenig geholfen. Alle medikamentösen und operativen Maßnahmen, die wir durchführten, haben auch beträchtliche Veränderungen des Plasmavolumens und des Volumens der Gewebeflüssigkeit mit sich gebracht. Da wir nur den Radiojodgehalt der Volumeinheit Plasma bestimmten und nicht in der Lage waren, auch Messungen des Plasmavolumens und des extracellulären Flüssigkeitsraumes durchzuführen, konnte kein Aufschluß über das gesamte extrathyreoidal kreisende Jod erhalten werden. Auch die Einbeziehung der Veränderungen des Körpergewichtes konnte diesen Mangel nur teilweise beseitigen, da nicht eindeutig klar-

gestellt war, inwieweit die Veränderungen des Körpergewichtes mit jenen der Flüssigkeitsvolumina parallel gingen. Es zeigte sich, daß dort, wo eine Verkleinerung dieser Volumina zu erwarten war — wie z. B. nach der Adrenal- oder Hypophysektomie —, eine Erhöhung der Jodkonzentration, und dort, wo eine Vergrößerung angenommen werden konnte — wie z. B. nach DCA-Behandlung — eine Verringerung der Jodkonzentration eingetreten war.

Ohne Zweifel genügen aber die Ergebnisse der Jodaufnahmemessungen, das derzeit sehr gebräuchliche Schlagwort vom „corticogenen Hypothyreoidismus" entschieden abzuschwächen. Es soll nicht geleugnet werden, daß in einer Reihe von Fällen Cortison tatsächlich die Aufnahme des Radiojods in die Schilddrüse beeinträchtigt — auch wir haben dies in einem Versuch an normalen und einem Versuch an adrenalektomierten Tieren gesehen — nur ist dies anscheinend nicht immer der Fall. Unter gewissen Umständen kann Cortison offenbar sogar eine gegenteilige Wirkung ausüben, über deren Gründe sich vorläufig genaueres nicht aussagen läßt.

Letzten Endes besteht kein Zwang, einen Antagonismus zwischen beiden Organen anzunehmen. Es ist ebensogut vorstellbar, daß das Optimum der Schilddrüsenfunktion von einer normalen Tätigkeit der Nebennierenrinde abhängt und Veränderungen der Nebennierentätigkeit, gleich in welcher Richtung, auf jeden Fall zu einer Abweichung vom Schilddrüsenfunktionsoptimum im Sinne einer Beeinträchtigung der Jodspeicherung führen. Wir wissen auch beim sogenannten „normalen" Tier nicht immer genau, ob es sich wirklich in einem völligen Nebennierenrinden-Gleichgewicht befindet und es ist denkbar, daß jene erste Gruppe von Normaltieren, die nach Cortison eine Erhöhung der Jodaufnahme zeigte, sich eben in einem gewissen Cortison-Mangelzustand befand, ebenso wie die „Terpentin-stress"-Gruppe, deren Jodaufnahme durch Cortison prompt erhöht wurde. Besonders nachdrücklich würden für diese Anschauung die schon zitierten, von Hill erhobenen Befunde sprechen, wonach bei Addison-Kranken Cortison zuerst die Jodaufnahme erhöht, um sie nach prolongierter Anwendung von Cortison, d. h. wenn das Funktionsoptimum der Schilddrüse bereits überschritten ist, wieder zu verringern. Auch die Steigerung der Jodaufnahme nach Cortison beim hypophysektomierten Tier ließe sich im Rahmen dieser Annahme zwanglos erklären.

Zusammenfassung.

An einer größeren Anzahl von Ratten wurde durch eine Reihe operativer und medikamentöser Maßnahmen versucht, die Frage nach der Art des Einflusses der Nebennierenrinde auf die Tätigkeit der Schilddrüse zu beantworten. Die Schilddrüsenfunktion wurde mit Radiojod in vitro gemessen. Folgende Befunde wurden erhoben:

Die Hypophysektomie sowie die Adrenalektomie führen zu einer Herabsetzung der Speicherung des Jods in der Schilddrüse und zu einer Erhöhung seiner Konzentration im Blut. Die Adrenalektomie verstärkt die Wirkung der Hypophysektomie, d. h. sie übt ihre, die Jodaufnahme in der Schilddrüse beeinträchtigende Wirkung auch ohne Anwesenheit der Hypophyse aus.

Die Schilddrüse des DCA-behandelten Tieres nimmt nicht weniger Jod als jene des normalen Tieres auf, doch sinkt die Jodkonzentration im Plasma.

„Stress" beeinträchtigt die Jodspeicherung in der Schilddrüse und erhöht den Plasmajodgehalt.

Die Reaktion auf Cortison ist verschieden: in einer Gruppe von Normaltieren und bei Adrenalektomierten bewirkte es eine Herabsetzung der Jodaufnahme der Schilddrüse, in einer weiteren Gruppe von Normaltieren, bei hypophysektomierten und „gestressten" Tieren eine Erhöhung derselben.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die neuerdings öfter vertretene Annahme, wonach Steroide der Nebennierenrinde einen antagonistischen Einfluß auf die Tätigkeit der Schilddrüse ausüben, nicht unter allen Umständen zutrifft. Es wird erwogen, ob nicht ein Funktionsgleichgewicht zwischen beiden Organen besteht, das sich sowohl bei Über- als auch bei Unterfunktion der Nebennierenrinde in Richtung einer Einschränkung der Schilddrüsentätigkeit auswirkt.

Anmerkung bei der Korrektur: Nach Abschluß dieser Untersuchungen sind noch folgende Arbeiten zu unserer Kenntnis gelangt: Nach Albert u. Mitarb. (Endocrinology **50**, 324, 1952) vermindert ACTH und Cortison zwar die Radiojodspeicherung, nicht aber das Ausmaß des Hormonausstoßes aus der Schilddrüse. Im Gegensatz dazu kann nach Halmi u. Mitarb. (Endocrinology **52**, 233, 1953) Cortison auch die Radiojodspeicherung nicht beeinträchtigen und auch nicht jene hypophysektomierter Ratten, die thyreotropes Hormon erhielten. Letzteres steht jedoch wiederum im Gegensatz zu den Ergebnissen von Paschkis u. Mitarb. (J. Clin. Endocr. Springfield **12**, 939, 1952, und Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **82**, 50, 1953). Eine ausgezeichnete Darlegung der Probleme um die Beziehungen zwischen Nebennierenrinde und Schilddrüse findet sich bei Albert (Ann. Rev. Physiol. **14**, 481, 1952).

Literatur.

Berson, S. A., and R. S. Yalow: J. Clin. Endocr. Springfield **12**, 407 (1952). — Chaikoff, I. L., and A. Taurog: in The Use of Isotopes in Biology and Medicine, University of Wisconsin Press, 1948. — Fisher, R. A.: Statistical Methods for Research Workers, Edinburgh, 1950. — Fisher, R. A., and F. Yates: Statistical Tables, Edinburgh, 1950. — Frederickson, D. S.: Assoc. for the Study of Internal Secretion, 33rd Meeting, Atlantic City 1951. — Halmi, N. S.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **80**, 175 (1952). — Hill, S. R., R. S. Reiss, P. H. Forsham and G. W. Thorn: J. Clin. Endocrin. Springfield **10**, 1375 (1950). — Keating, F. R. jr., S. F. Haines, M. H. Power, and M. M. D. Williams: J. Clin. Endocr. Springfield **10**,

1425 (1950). — Marine, D.: J. Amer. Med. Assoc. **104**, 2250 (1935). — Money, W. L., L. Kraintz, L. Kirschner, P. Merill, and R. W. Rawson: J. Clin. Endocr. Springfield **10**, 1282 (1950). — Paschkis, K. E., A. Cantarow, T. Eberhard and D. Boyle: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **73**, 116 (1950). — Perry, W. F.: Endocrinology **49**, 284 (1951). — Soffer, J. L., J. L. Gabrilove and W. R. Dorrance: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **76**, 763 (1951). — Thorn, G. W., S. S. Dorrance and E. Day: Ann. Int. Med. **16**, 1053 (1942). — Veall, N.: Brit. J. Radiol. **21**, 347 (1948). — Verzar, F., u. V. Vidovic: Helvet. physiol. pharmacol. acta **9**, 214 (1951). — Wolfson, W. R., W. H. Beierwalters, W. D. Robinson and I. T. Duff: J. Labor. a. Clin. Med. **36**, 1005 (1950).

Prof. Dr. K. Fellinger, Wien, 2. Med. Univ.-Klinik.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 456—465 (1953).

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Graz,
(Vorstand: Prof. Dr. R. Rigler).

Untersuchungen über die wechselseitigen Beziehungen von ACTH zu Intermedin: Kinetik der Intermedinwirkung an der Froschhaut*.

Von
R. Rigler und Marg. Holzbauer.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. Februar 1953.)

Länger dauernde ACTH-Behandlung hat unter Umständen Dunkelfärbung der Haut, ähnlich der bei M. Addison bestehenden, zur Folge. Diese Erscheinung wurde, wenig logisch zwar, da die Dunkelfärbung auf vermehrter Melaninbildung, nicht aber auf Melanophorenausbreitung beruht, für die Wirkung von gleichzeitig verabfolgtem, melanophorenausbreitenden Hormon gehalten. In der Tat führt die Injektion von ACTH-Präparaten am helladaptierten Frosch auch nach Hypophysektomie zur Melanophorenexpansion, womit die Gegenwart von Intermedin als Begleitstoff bewiesen zu sein schien. In dieser Auffassung trat ein Wandel ein, als Johnsson u. Högberg vor Jahresfrist behaupteten, im chemischen Betragen des adrenocorticotropen und des melanophorenausbreitenden Hormons bestehe kein Unterschied. Sie verwiesen auf die übereinstimmende Empfindlichkeit der den Wirkungen zugrunde liegenden, bisher für trennbar gehaltenen Stoffe gegen Nitrit, Formaldehyd, Trypsin und verschiedene Organbreie, wozu noch das gleichartige Verhalten bei der Papierchromatographie käme. Außerdem beobachteten sie bei 5 von 6 an M. Addison Erkrankten, desgleichen bei einem Fall von hypophysär bedingtem M. Cushing einen erhöhten Intermedingehalt des Serums. Zusammenfassend erklärten Johnsson u. Högberg ACTH und Intermedin für identisch oder enge miteinander verwandt und empfahlen den Melanophorentest seiner einfachen Durchführbarkeit wegen zur Hormonauswertung.

Solange keiner der Stoffe in reiner Form vorliegt, bewegen sich die Ausführungen Johnssons u. Högbergs trotz mancher für sie sprechender Umstände im Bereich der Hypothese.

Im übrigen hatte 1934 Jores die gleiche Vermutung geäußert. Seit dem Erscheinen der Mitteilung Johnssons u. a. wurde die Frage der Identität an verschiedenen Stellen nachgeprüft. Thing sowie Sulman kamen zu einem bestätigen-

* Herrn Prof. Dr. O. Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

den Ergebnis, wobei allerdings die von Sulman verwendete Methode der Intermedinbestimmung am normalen Frosch ohne vorhergehende Hypophysektomie nicht letzte Gewähr für Genauigkeit zu bieten scheint. Diesen beiden Autoren steht der ablehnende Standpunkt der von Li geführten Gruppe gegenüber, welche gegen die Identität Gründe wie verschiedenes chromatographisches und elektrophoretisches Verhalten ins Treffen führt. Allerdings kommt auch sie an der Tatsache nicht vorbei, daß eine völlige Trennung der beiden Wirkungen nicht gelungen ist, daß ferner der unerwartet hohe ACTH-Gehalt des bisher nur als Intermedinbildungsstätte bekannten Zwischenlappens der Froschhypophyse zu einer Erklärung drängt. Anmerkungsweise sei erwähnt, daß der gleiche Autor eine auf Grund chromatographischer Analysen von Dixon, Stack-Dunne, Young u. Cater behauptete Spaltungsmöglichkeit des adrenocorticotropen Wirkstoffes in einen „adrenal weight increasing" und einen „ascorbic acid reducing" Faktor in Zweifel zieht.

Die im Falle ihrer Bestätigung für die Diagnostik endokriner Störungen wichtigen Befunde der schwedischen Autoren gaben zu Untersuchungen über die Reaktionskinetik der Intermedinwirkung an der Froschhaut Anlaß.

Methodik.

Nach Ausschluß aller unzureichenden Methoden stehen für die Feststellung des Intermedingehaltes von Organauszügen oder im Körper vorhandenen Flüssigkeiten zwei Wege offen und zwar die Prüfung a) am hypophysenlosen Frosch, b) an der isolierten Froschhaut. Beide Verfahren haben Vor- und Nachteile. Am Ganztier werden die Melanophoren ständig vom Saftstrom umspült und bewahren dadurch ihre Reaktionsfähigkeit unabhängig von der Versuchsdauer. Andererseits muß die Auswertung am Gesamttier wegen individueller Unterschiede in der Aufnahme-, Abbau- und gegebenenfalls Ausscheidungsgeschwindigkeit des Hormons, wozu der verschiedene Grad von Gegenregulationen kommt, eine erheblich stärkere Streuung in Kauf nehmen als die Prüfung am isolierten, leicht der Eichung zugänglichen Organ. An der isolierten Froschhaut besteht zudem noch die Möglichkeit einer exakten Messung der Chromatophorenausbreitung durch Verfolgung der Lichtdurchlässigkeitsänderung mittels geeigneter optischer Geräte. Wir haben uns daher für dieses Verfahren entschieden. Die Zahl der an einem Hautstück durchführbaren Versuche ist wie bei jedem Organ eine beschränkte, doch wird der geringe Nachteil durch den Umstand ausgeglichen, daß mehrere Hautstücke von annähernd gleicher Lichtdurchlässigkeit und Reaktionsfähigkeit vom selben Tier erhältlich sind. Die Messung der Lichtdurchlässigkeit und ihrer Änderung erfolgte im Pulfrich-Photometer von C. Zeiss. Zu diesem Zweck wurden in der Regel 6 aus verschiedenen Körperpartien von rana esculenta gewonnene, von anhaftendem Gewebe und Blut befreite Hautstückchen in Plexiglasrähmchen eingespannt, deren lichte Weite der Blendenöffnung des Photometers bei Trommelstellung $E = 0$ angepaßt war. Jedes Rähmchen ließ sich in eine Planküvette von 1 cm Wandabstand in der Durchstrahlungsrichtung und etwa 4 ml Fassungsraum einsetzen. Die Flüssigkeitsmenge, in der sich das Hautstück innerhalb der Küvette befand, betrug 2,5 ml Ringer-Lösung folgender Zusammensetzung: 0,6% NaCl, 0,014% KCl, 0,012% $CaCl_2$, 0,02% $NaHCO_3$, 0,001% NaH_2PO_4. Wie die Erfahrung lehrte, eignen sich vor allem Hautstücke, in deren durchleuchteten Partien sich Melanophorenanhäufungen in Form reiskorngroßer Flecke vorfinden. Die als Ruhe- bzw. Ausgangslage für die Intermedinversuche erforderliche Melaninballung in den Pigmentzellen trat nach einer Wartezeit von 30 bis längstens 120 min ein. Die Versuchstemperatur entsprach der jeweiligen Zimmertemperatur. In der Zeit zwischen den

Messungen wurden die Hautstücke gleichmäßig belichtet. Die Messung der unter der Hormoneinwirkung eintretenden Änderung der Lichtdurchlässigkeit erfolgte stufenphotometrisch unter Verwendung des Rot-Filters L 1 in der Weise, daß zunächst bei voll geöffneten Blenden die Lichtabsorption der ruhenden Froschhaut durch Zwischenschaltung einer Tuschesuspension in den Strahlengang des Vergleichrohrs weitgehend ausgeglichen und nur das jetzt noch bestehende Absorptionsdefizit durch Verstellen der Meßtrommel beseitigt wurde. Die an der Meßtrommel dabei abzulesende Extinktion wurde mit E_o, die nach Intermedineinwirkung feststellbare mit E_i und die nach maximaler Melanophorenexpansion zu beobachtende mit E_m bezeichnet.

Meßergebnisse und ihre Deutung.

Um eine möglichst große Zahl von Daten zwecks statistischer Ermittlung der wahren Werte zu erhalten, wurde aus den dazu geeigneten Hautpartien von 4 Eskulenten je 6, insgesamt also 24 Hautproben ent-

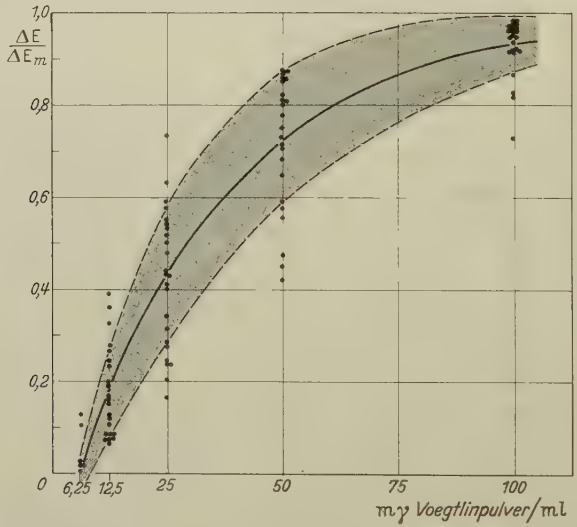


Abb. 1. Relative Extinktionszunahmen als Funktion der verwendeten Intermedinkonzentrationen.

nommen und stufenphotometrisch auf die Änderung der Lichtdurchlässigkeit geprüft. Zur Einwirkung gelangten verschiedene Intermedinkonzentrationen, die eine geometrische Reihe mit dem Faktor 2 bildeten, beginnend mit 6,25 Milligamma eines Standardpräparates je ml bis zu Mengen, die über die zur Erzielung einer maximalen Melanophorenexpansion erforderlichen hinausreichten. Das Standardpräparat war ein nach Voegtlin aus Hypophysenhinterlappen hergestelltes Aceton-Trockenpräparat, von dem 10 mg mit einem Tropfen 0,25%iger Essigsäure angeteigt, in ungefähr 10 ml Essigsäure der gleichen Konzentration aufgenommen und mit gepufferter Froschringerlösung auf ein Volumen

von 100 ml gebracht wurden. Weitere daraus mit Froschringer hergestellte Verdünnungen zeigten den gleichen p_H-Wert wie die Verdünnungsflüssigkeit.

Trägt man die bei verschiedenen Intermedinkonzentrationen beobachteten relativen Extinktionszunahmen, d. h. die auf die maximalen bezogenen, in ein Koordinatensystem ein, so ergibt sich die nebenstehende Abb. 1, in der auch die Mittelwerte aller mit der gleichen Konzentration erzielten Effekte verzeichnet sind.

In Anbetracht der Streuung ergeben sich mehrere Möglichkeiten der funktionellen Beziehung zwischen den Wertepaaren. In das grau getönte Feld, welches durch die mittlere Abweichung der Einzelwerte jeder Gruppe begrenzt ist, lassen sich

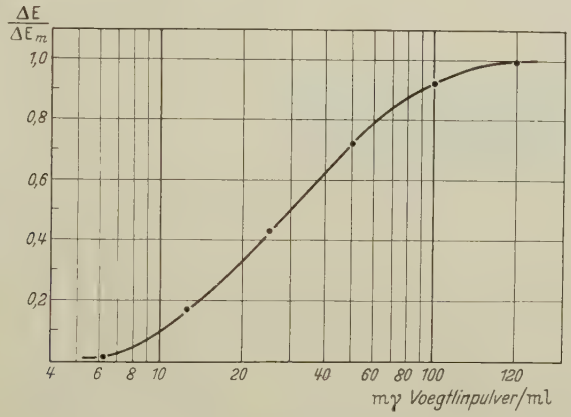


Abb. 2. Relative Extinktionszunahmen als Funktion der Logarithmen der verwendeten Intermedinkonzentrationen.

Kurvenabschnitte projizieren, die einer Hyperbel-, Parabel-, oder Exponentialgleichung entsprechen können. Selbst die funktionsmäßige Erfassung jenes Kurvenabschnittes, der die Mittelwerte verbindet, ist nicht eindeutig möglich. Der Versuch einer Kurvenstreckung durch Übertragung der Mittelwerte auf einfach logarithmisches Papier führte zu dem in Abb. 2 dargestellten Ergebnis. Die sigmoide Form spricht für ein Gleichgewicht nach dem Massenwirkungsgesetz. In praktischer Hinsicht bietet der fast geradlinig verlaufende Mittelteil die Möglichkeit der Aufstellung einer Interpolationsformel für Auswertungen. Er stellt die bekannte Log.-Dos.-Wirkungskurve dar.

Kurven vom Aussehen der obigen entsprechen z. B. den Dissoziationskurven schwacher Elektrolyte. Für weitere Überlegungen interpretierten wir sie arbeitshypothetisch als Dissoziationskurve eines Intermedin-Receptorkomplexes (I. R) und unterstellten, daß die Gesamtzahl der für die Intermedinbindung geeigneten Zellreceptoren unveränderlich von vornherein gegeben ist, während die Intermedinkonzentration theoretisch jeden Wert bis ∞ annehmen kann. Der wahre Verlauf der Dissoziationskurve eines derartigen (I. R) dürfte möglicherweise steiler sein, da in unmittelbarer Nähe der Zellreceptoren, sozusagen am Wirkungsort, die

Intermedinkonzentration hinter jener im Außenmedium zurückzubleiben scheint und zwar um so mehr, je höher die Zahl intermedingebundener Receptoren ist. Gründe für diese Annahme sollen erst nach der Besprechung des weiteren Schicksals des (I. R) vorgebracht werden.

Im übrigen ist die Vorstellung einer dem Massenwirkungsgesetz gehorchenden Reaktion zwischen Zellreceptoren und Stoffen verschiedener chemischer Zusammensetzung bereits von Clark, ferner von Gaddum verwendet und erst neuerdings in einer Monographie von A. Albert ausführlich behandelt worden.

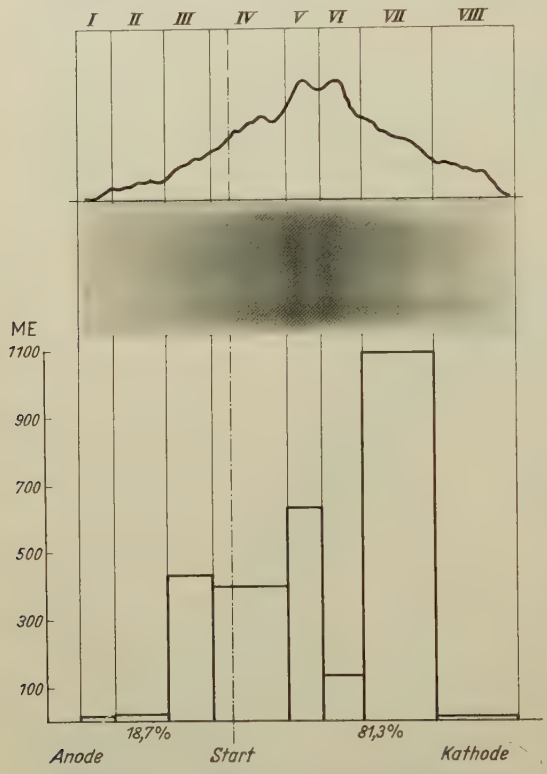


Abb. 3. Das Schaubild zeigt im oberen Anteil das Elektropherogramm eines ACTH-Präparates mit darüberstehender photometrischer Auswertung. Darunter befinden sich die biologisch bestimmten Intermedinaktivitäten.

Eine der Voraussetzungen dieser Annahme bildet das Bestehen eines Ladungsunterschiedes zwischen Receptor und Intermedin, d. h. die Möglichkeit der gegenseitigen salzartigen Bindung. Um die Verhältnisse von dieser Seite zu klären, wurde ein ACTH-Präparat vom dreifachen Reinheitsgrad des La-1-A Standards der Papierelektrophorese in der Modifikation von Grassmann u. Hannig unter Verwendung eines Veronal-Natriumacetat-Puffers von der Ionenstärke $\mu = 0{,}1$ und p_H 8,6 unterworfen, deren Ergebnis der obere Teil der nebenstehenden Abb. 3 zeigt. Ein parallel angefertigtes Elektropherogramm wurde nicht entwickelt, sondern in Streifen geschnitten, die einzeln mit n/10 HCl eluiert und auf ihren Intermedingehalt biologisch geprüft wurden. Das Ergebnis ist im untenstehenden Teil der Abb. 3 enthalten. Aus ihm geht die kationische Natur des Intermedins auch einem p_H von 8,6 gegenüber hervor. Die Verteilung der wirksamen Komponente über eine größere Strecke deutet darauf hin, daß im vorliegenden Präparat das Intermedinmolekül durch Begleitstoffe teilweise an seiner Wanderung im elektrischen Feld gehemmt wird. Das Ergebnis der biologischen Auswertung war reproduzierbar, insbesondere erwies sich der Unterschied

im Intermedingehalt der Streifen VI und VII als charakteristisch. Aus diesem Versuch darf geschlossen werden, daß entsprechend einem oberhalb p_H 8,6 gelegenen i. P. das Intermedin bei der absoluten Reaktion der Froschringerlösung zum überwiegenden Teil in ionisierter Form vorliegt. Mit Rücksicht auf die kationische Natur des Intermedins müssen dem Receptor zur Erfüllung seiner Bindungsaufgaben negative Ladungseigenschaften zukommen. Indirekt läßt sich dies durch einen später zu demonstrierenden Versuch mit Serum wahrscheinlich machen, in welchem Serumeiweißkörper zum Teil die Rolle der Receptoren übernehmen. Dabei kommt es zu einer Art von competitive inhibition im Sinne eines Wettstreites um das Wirkstoffmolekül. Die Serumeiweißkörper ersetzen in diesem System durch ihre Menge, was ihnen an Spezifität des Bindungsvermögens fehlt.

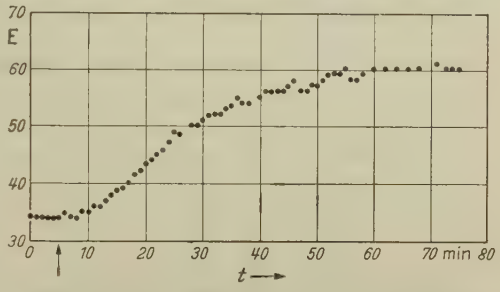


Abb. 4. Zeitlicher Verlauf der Lichtdurchlässigkeitsänderung eines Froschhautstückes nach Intermedinzusatz. Ordinate: Extinktionswerte; Abszisse: Zeit in Minuten. Beim Pfeil erfolgte der Ersatz der normalen RINGERlösung durch intermedinhaltige (0,025 γ VOEGTLIN-Pulver/ml).

Manches spricht dafür, daß der (I. R) nur die Rolle eines kurzlebigen Zwischenproduktes spielt, das zu existieren aufhört, sobald das Intermedinmolekül seinen Energieinhalt über den Receptor auf die Zelle übertragen hat und auf eine niedrigere Energiestufe abgesunken ist. Dergestalt freigewordene Receptoren sind im Rahmen des Massenwirkungsgesetzes zu neuer Komplexbildung befähigt. Diese Vorstellung setzt einen meßbaren Intermedinverbrauch voraus. Er läßt sich durch einen Versuch nachweisen, der durch seine Einfachheit überraschen mag. Aus zahlreichen Beobachtungen war bekannt, daß die Lichtdurchlässigkeit von Hautstücken in einer Intermedinlösung von gegebener Stärke bis zu einem bestimmten Ausmaß abnimmt und durch lange Zeit dann auf dieser Höhe stehen bleibt. Die Auftragung der auf der Meßtrommel abgelesenen Extinktionswerte gegen die Zeit ergibt die obenstehende Abb. 4. Der Ersatz der Intermedinlösung durch RINGER führt zur Wiederaufhellung, was üblicherweise als Auswascheffekt angesehen wird.

Anders muß die Interpretation lauten, wenn der gleiche Effekt eintritt, nachdem der größte Teil der Intermedinlösung aus der Küvette entfernt und diese in eine feuchte Kammer verwandelt wird. Hier kann es sich wohl nur im Sinne der obigen Darstellung um den Aufbrauch des (I. R) und in weiterer Folge der geringen noch unverbrauchten Intermedinmengen handeln, welche im Gewebe und der ihm adhärierenden

Flüssigkeitsschicht vorhanden sind. Nach unseren bisherigen Versuchen scheint es dabei nichts auszumachen, ob die Gasphase der feuchten Kammer durch atmosphärische Luft oder N_2 gebildet wird. Kontrollversuche an nicht mit Intermedin vorbehandelten Hautstücken zeigen keinen ähnlichen Effekt. Wir haben uns bemüht, die Halbwertszeit des Intermedin-Zellreceptorkomplexes an Hand des zeitlichen Verlaufs der Lichtdurchlässigkeitszunahme zu ermitteln. Die dabei auftretenden Schwierigkeiten bestehen hauptsächlich darin, daß nicht nur der (I. R) vorliegt, sondern wie bereits erwähnt, noch unbekannte, wenn auch geringe Intermedinmengen zugegen sind, aus denen der (I. R) nach-

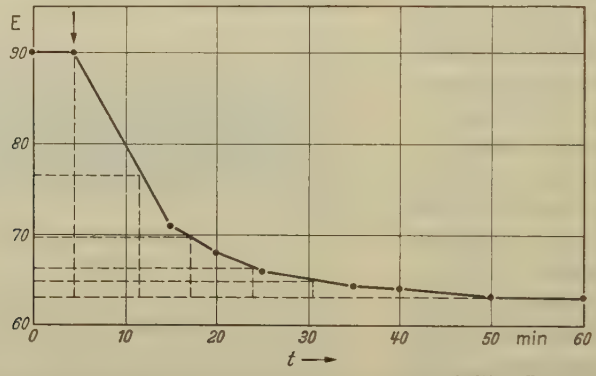


Abb. 5. Abnahme der Extinktion nach Entfernung der intermedinhaltigen Ringerlösung und Verwandlung der Küvette in eine feuchte Kammer. Es sind die Zeiträume angegeben, welche jeweils bis zur Halbierung des noch vorhandenen Effektes verstreichen. Sie betragen aufeinanderfolgend in Minuten: 7,0, 5,75, 6,75, 6,50.

gebildet werden kann. Immerhin weisen die bisherigen Versuche darauf hin, daß der Zerfall des (I. R), wie der obenstehenden Abb. 5 zu entnehmen ist, wahrscheinlich nach dem Exponentialgesetz vor sich geht.

Bei der Erreichung des dynamischen Gleichgewichtes, wie es die Abb. 4 zeigt, müssen Größe des Verbrauchs und Höhe des Intermedinnachschubes einander gleichkommen. Die Nachlieferung setzt eine entsprechende Differenz der Intermedinkonzentration im Außenmedium und am eigentlichen Wirkort voraus. Je schneller der (I. R) zerfällt, umso größer muß der Nachschub, umso erheblicher aber auch der Konzentrationsunterschied sein. Damit wird die eingangs erwähnte Vermutung verständlich, zufolge der im Außenmedium gemessene Intermedinkonzentration umso weniger den tatsächlich am Wirkort vorhandenen entsprechen, je höher der Intermedinumsatz ist.

Die oben vorgebrachten, zum Teil experimentell gestützten Gedankengänge wurzeln in Vorstellungen, an deren Entwicklung in erster Linie die klassischen Enzymstudien von Michaelis u. Menten Anteil haben. Bekanntlich führten Untersuchungen dieser Autoren zur Annahme

eines dem Massenwirkungsgesetz gehorchenden Gleichgewichtes zwischen Enzym (E) und Substrat (S) und einem in dauerndem Zerfall begriffenen Komplex beider (E. S), aus dem das Enzym zum Unterschied vom Substrat unverändert hervorgeht. Die Analogie zwischen beiden Vorstellungen erfolgt aus der Gleichsetzung des Receptors mit dem Enzym, sowie des Intermedins mit dem Substrat. Es bedarf wohl keines Hinweises, daß das von uns untersuchte System ungleich komplizierter als das Enzym-Substrat-System von Michaelis u. Menten ist. Es erhebt sich überhaupt die Frage, inwieferne man berechtigt ist, bei so komplizierten Vorgängen wie jenen der Intermedinwirkung auf die Froschhaut von Kinetik zu sprechen, sofern darunter das Studium der Geschwindigkeit chemischer Reaktionen und der Faktoren verstanden werden soll, die diese Geschwindigkeit beeinflussen. Die Legitimation für die Verwendung dieses Begriffs kann im Versuch der Halbwertszeitermittlung für den (I. R.) erblickt werden, dessen Zerfall die Gesetzmäßigkeit einer Reaktion erster Ordnung aufweist.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen war die Prüfung verschiedener ACTH-Präparate auf ihren Intermedingehalt.

Zur Ermittlung der erforderlichen Log.-Dos.-Wirkungskurve verwendeten wir die meßtechnischen Erfahrungen von Frieden u. a. Sämtliche Wirkungen wurden durch ihr Verhältnis zur Wirkung einer Standardkonzentration von 50 Milligamma Voegtlin-Pulver/ml ausgedrückt. Die Signifikanz des Richtungskoeffizienten $b = 0{,}98$ und damit die Wahrscheinlichkeit des linearen Verlaufes im verwendeten Bereich ist durch den Wert $t - 24{,}5$ nach Fisher gesichert. Die mittlere Abweichung aller Einzelbeobachtungen von der Regressionslinie beträgt $s = 0{,}115$. Der Intermedingehalt wurde an ACTH-Präparaten von drei durch ihre langjährige Erfahrung auf dem Hormongebiet bekannten Firmen und zwar The Armour Laboratories (Chicago), Farbwerke Höchst (vormals I. G. Farbenindustrie Frankfurt a. M.) und Schering A.G. (Berlin-West) bestimmt. Da kein Urteil mit den vorliegenden Untersuchungen über Reinheitsgrad oder sonstige Eigenschaften der anscheinend aus verschiedenen Entwicklungsstadien stammenden Präparate beabsichtigt ist, haben wir sie mit laufenden Buchstaben des Alphabets bezeichnet. Sämtliche Firmen standardisierten ihre Präparate im Zeitpunkt der Herstellung nach der „adrenal ascorbic acid depletion" Methode von Sayers, Sayers u. Woodbury. Da wir nicht mit demselben statischen Aufwand ACTH-Auswertungen vorzunehmen in der Lage waren, wie dies den genannten Firmen möglich ist, beschränkten wir die Untersuchungen auf den Vergleich der angegebenen adrenocorticotropen Wirksamkeit mit der von uns in den einzelnen Präparaten nachgewiesenen melanophorenexpandierenden.

Hier sind einige methodische Bemerkungen einzuflechten. Für die Intermedinauswertung an der isolierten Froschhaut kommen drei Möglichkeiten in Betracht:

1. Der Vergleich verschiedener Konzentrationen eines Standardpräparates mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Lösung am gleichen Froschhautstück in Analogie zu dem Verfahren der Oxytocinauswertung am Rattenuterus nach P. Holton. Es setzt eine ausreichend schnelle Reversibilität des eingetretenen Effektes voraus. Da die lange Zeitdauer bis zur Rückkehr zum Ausgangspunkt die mögliche Zahl der Versuche an der Froschhaut beschränkt, erscheint diese Form der Testung als ungeeignet.

2. Die Ablesung der Wirkungsstärke aus einer Standardkurve; dieses Verfahren erfordert, daß für die unbekannte Probe der gleiche Richtungskoeffizient gilt, wie für das Standardpräparat. Aus später zu erörternden Gründen trifft diese Voraussetzung nicht immer zu. Zum Teil läßt sich diese Schwierigkeit durch Errechnung eines kombinierten Richtungskoeffizienten umgehen, womit wir aber zu der in den folgenden Versuchen verwendeten

3. Methode kommen, deren Prinzip in der Fachliteratur als „6-Point-assay" bezeichnet wird. Unsere Berechnungen erfolgten an Hand der von Mather, Finney, Brownlee sowie Pugsley mitgeteilten Grundlagen der statistischen Methoden.

Das Ergebnis dieser vergleichenden Versuche zeigt die nebenstehende Tab. 1. Ihr Studium lehrt, daß zwischen der melanophorenexpandierenden Wirkung und der nebennierenascorbinsäuresenkenden der ACTH-Präparate im Fall A zu B eine positive Korrelation besteht, im Fall

Tabelle 1. *Vergleich der melanophorenexpandierenden und nebennierenascorbinsäuresenkenden Wirkung von ACTH-Präparaten; Streuungsbereich nach* Pugsley *für* $p = 0{,}95$.

Präp. A: 0,05 γ	= 9,82 — 12,8 ME
1 I.E. ACTH	= 58900 — 76800 ME
Präp. B: 0,05 γ	= 0,36 — 0,87 ME
1 I.E. ACTH	= 32260 — 77950 ME
Präp. C: 0,05 γ	= 27,18—34,78 ME
1 I.E. ACTH	= 95130—121730 ME
Präp. D: 0,05 γ	= 2,42—3,04 ME
1 I.E. ACTH	= 89540—112332 ME

jedes der beiden zu C und D jedoch keine positive Korrelation nachzuweisen ist. Zwischen C und D dagegen besteht eine solche wieder. In der Tabelle wurde willkürlich die Wirkung von 0,05 γ Vögtlin-Pulver/ml auf die Lichtdurchlässigkeit der isolierten Froschhaut als 1 Melanophoreneinheit (ME) bezeichnet. Danach wäre eine Identität von adrenocorticotropem Wirkstoff und Intermedin zu verneinen, eine Feststellung, zu der auch Li u. a. inzwischen gelangt sind. Es läßt sich damit aber nicht die Möglichkeit ausschließen, daß zwischen beiden in genetischer sowie chemischer Hinsicht Beziehungen bestehen (vgl. Einleitung). Manches spricht für ein gemeinsames Ausgangsmolekül beider Stoffe, mit dessen Vorhandensein im Blut man praktisch zu rechnen hätte. So beobachteten wir, ähnlich wie Högberg u. Johnsson, einen ungewöhnlich hohen Intermedingehalt des Blutes eines Addisonikers. Eine erhöhte adrenocorticotrope Wirksamkeit des Serums bei dieser Erkrankung war bereits von Taylor, Sprague and Sprague festgestellt worden.

Versuche der Auswertung von Seren setzen aber gewisse Vorsichtsmaßnahmen voraus. Es zeigte sich, daß dem Serum zugesetztes Intermedin dem Nachweis durch Bindung an Plasmaeiweißkörper teilweise entgeht. Andererseits sind u. U. Stoffe vorhanden, die eine gegenteilige, melanophorenkontrahierende Wirkung besitzen.

Zusammenfassung.

An der isolierten Froschhaut läßt sich mit Hilfe des PULFRICHschen Stufenphotometers die unter Intermedin erfolgende Abnahme der Lichtdurchlässigkeit quantitativ verfolgen. Stellt man die Logarithmen der verwendeten Intermedinkonzentrationen den beobachteten relativen Extinktionszunahmen, d. h. den auf die maximalen bezogenen gegenüber, so erhält man eine Kurve vom Aussehen der Dissoziationskurve eines schwachen Elektrolyten. Sie wird als funktioneller Ausdruck eines in Abhängigkeit von der Intermedinkonzentration verschiedene Größe aufweisenden Intermedin-Receptorkomplexes erklärt. Dieser Komplex ist analog einem intermediär gebildeten Enzym-Substratkomplex in ständigem irreversiblen Zerfall begriffen, der exponentiellen Charakter trägt.

Bei 4 von verschiedenen Firmen hergestellten ACTH-Präparaten konnte nur in je 2 Fällen eine positive Korrelation zwischen ihrer melanophorenexpandierenden und der nebennierenascorbinsäuresenkenden Wirkung beobachtet werden.

Literatur.

ALBERT: Selective Toxicity. London: Methuen and Co. 1951. — BROWNLEE: Industrial Experimentation. Fourth Edition. London: His Majesty's Stationary office 1949). — CLARK: J. of Physiol. **61**, 530, 547 (1926). — DIXON, STACK-DUNNE, YOUNG and CATER: Nature **168**, 1084 (1951). — FRIEDEN, FISHBEIN u. HISAW: Arch. of Biochem. **17**, 183 (1948). — FINNEY: Aus Burn: Biological Standardization. Oxford Univ. Press 1950. — GADDUM: J. of Physiol. **89**, 7P (1937). — GRASSMANN u. HANNIG: Hoppe-Seylers Z. **290**, 1 (1952). — HOLTON: Brit. J. Pharmacol. **3**, 328 (1948). — JOHNSSON u. HÖGBERG: Nature **169**, 286 (1952). — JORES: Z. exper. Med. **94**, 293 (1934). — MATHER: Statistical Analysis in Biology. London: Methuen and Co. 1946. — MICHAELIS u. MENTEN: Biochem. Z. **49**, 333 (1913). — PUGSLEY: Endocrinology **39**, 161 (1946). — REINHARDT, GESCHWIND, PORATH and LI: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **80**, 439 (1952). — REINHARDT, GESCHWIND and LI: Acta Endocrin., Kobenh. **8**, 393 (1951). — SAYERS, SAYERS and WOODBURY: Endocrinology **42**, 379 (1948). — SULMAN: Nature **169**, 588 (1952). — Acta Endocrin., Kobenh. **10**, 320 (1952; **11**, 1 (1952). — TAYLOR, SPRAGUE and SPRAGUE: Endocrinology **45**, 335 (1949). — THING: Acta Endocrin., Kobenh. **10**, 295 (1952); **11**, 74 (1952).

Prof. Dr. R. RIGLER, Physiol. Inst. der Univ. Graz, Harrachgasse 21.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 466—468 (1953).

Departments of Surgery — New York University — Post Graduate Medical School and Physical Medicine and Rehabilitation, New York University College of Medicine.

Effect of thiourea and thyroxine on oxygen uptake of tissue homogenates*.

By

L. Corsan Reid.

(Eingegangen am 23. Februar 1953.)

It has been widely held since the publication of the anti thyroid action of thiourea by the MacKenzies[9] and its remarkably beneficial effects in patients with thyrotoxicosis, by Astwood[1, 2, 3] and others, that this was a specifically selective action on the thyroid. The lowering of the B.M.R., the return to normal levels of serum cholesterol, and the relief of all symptoms were, and still are, ascribed to the action of thiourea in specifically interfering with the synthesis of the thyroid hormone. This is considered to cause a lowering of the blood level of the hormone, which leads to increased anterior pituitary activity and thyroid enlargement, in spite of functional impairment as compared to the pre thiourea period. Keston[8] demonstrated that thiourea decreased the organic binding of iodine in vivo and in vitro. Many subsequent studies support the concept of depression by thiourea of those specific enzyme systems or a particular enzyme, primarily, if indeed, not exclusively concerned in the actual synthesis of the thyroid hormone. Other evidence, however, could be interpreted that antithyroid drugs were not specifically restricted to inhibiting the synthesis of the thyroid hormone. Franklin et al,[6, 7] showed that oxidative mechanisms were required for the iodination of thyroxine and this was prevented by thiouracil and other oxidative inhibitors as well. Denny[5] showed thiourea acts as an antioxidant in the prevention of the discoloration of fruit, and Williamson[10] showed thiourea prevented the formation of peroxides in fats. Cruz Coke et al [4] state that the livers of thyrotoxic rats have increased oxygen uptake with butyrate and succinate and this was inhibited by thiourea. They also state that thiourea and thiouracil inhibited the basal uptake of oxygen in the liver and the thyroid.

Appreciation is expressed for the generous help of Dr. Efriam Racker, and my associates, Mrs. Zara Ralph, Mrs. Rhoda Nadel, aud Miss Jane Lafetre. Thanks are due to Armour & Co. Inc., for an liberal supply of L-Thyroxine, and to Dr. Albert Keston for the D-l-thyroxine.

During the course of an extensive investigation into the mechanism of action of the antithyroid drugs, a number of interesting observations were made which do not appear to have been brought out previously in the literature.

Studies on thyroid slices from patients with thyrotoxicosis of all degrees of severity prepared preoperatively by a wide variety and combination of antithyroid drugs and other forms of therapy, gave such variable findings that no reliable interpretation could be placed upon

* In honor of Prof. Dr. O. Loewi on his 80th birthday.

them. However, a working hypothesis was evolved that thiorea inhibited the energy production in the thyroid rather than the precise and specific enzymatic steps involved in the synthesis of the thyroid hormone. In order to test this hypothesis experimentally, the effect of thiourea on oxygen uptake in tissue homogenates from mice and rats was studied with the WARBURG technique. In every tissue with 100 micromoles of potassium succinate as substrate, there was a decreased oxygen uptake in the presence of thiourea, except the heart. This statement is made on the basis of 26 experiments with liver, 12 with kidney, 4 with spleen, 4 with brain, and 1 each of gastric mucosa and skeletal muscle. On the other hand, in 18 experiments on the heart, in no single instance was there a significant reduction of oxygen uptake, while regularly there was a small, but definite increase. It should be stated that oxygen consumption without added substrate in the heart was negligible. Thiourea without substrate had no obvious effect on oxygen consumption. When potassium succinate was replaced with 100 micromoles of alpha-ketoglutarate, or citrate or malate, thiourea produced a reduced oxygen uptake in kidney, liver and brain homogenates, comparable to that found with succinate.

When the sodium salt of L-thyroxine was added directly to the homogenate in a concentration of 3 γ per ml., there was a definite increase in oxygen uptake. This was still more pronounced with 4 γ per ml.

Table 1. *Figures in microliters per hour.*

Organ	Control	Thiourea 150 micromols per ml.	Thyroxine 3 γ per ml.	Thyroxine 3 γ thiourea 150 micromols per ml.	Thyroxine 4 γ per ml.	Thyroxine 4 γ thiourea 150 micromols per ml.
Liver . . .	681	585	752	733		
Liver . . .	356	293	471	392	560	542
Kidney . .	608	478	697	611		
Kidney . .	240	227	288	281	309	321
Brain . . .	184	147	238	210		
Brain . . .	265	205	352	275		
Heart . . .	753	753	850	805		
Heart . . .	849	862	896	868		

When thiourea and thyroxine were added together to homogenates of liver, kidney, brain, and heart in the same concentrations as above, the action of thiourea was markedly minimized and with thyroxine in a concentration of 4 γ per ml., no significant depression of oxygen uptake occured with 150 micromols of thiourea per ml. In this series there were eight experiments with liver, eight with kidney, six with heart, and four with brain. Some typical experiments are shown in following table.

No changes in oxygen uptake were observed with 0.3 γ per ml. of thyroxine or less. Significant decreases in oxygen uptake were observed frequently with 30 micromols of thiourea per ml. of homogenate and always with 90 micromols per ml.

The difference in the action of thiourea on the heart, as compared to other organs, was impressive and surprising, but probably should not have been so, in view of the clinical observation that the decrease in the B.M.R., is a much more obvious finding in patients with thyrotoxicosis treated with thiourea, than the drop in pulse rate. In any event, it is in line with other evidence that the energy transfer mechanism in the myocardium, has unusual features.

While it is always dangerous to form conclusions from experiments in vitro and apply these to intact cells and organs, it is difficult for one to avoid considering the possibility that thiourea is not a specifically selective antithyroid drug, but is a general depressant to all cells in their utilization of oxygen. In other words, less thyroid hormone is formed with thiourea because the release of energy is restricted, due to the interference with oxygen utilization.

In summary, one might say that these experimental findings suggest that;

1. Thiourea inhibits oxygen utilization in all organs and tissues except the heart.

2. Thiourea is a general cell antioxidant, and in its restriction of energy transfer, makes less energy available for the cell to be directed to the synthesis of a special product like the thyroid hormone.

3. Thiourea usually increases oxygen consumption in homogenates of myocardium.

L-thyroxine as its sodium salt always increased oxygen consumption in a concentration of 3 γ per ml., and minimized markedly, the action of thiourea. In a concentration of 4 γ per ml., no action of thiourea could be observed.

5. There is the possibility that hormones and drugs have part of their action, at least, at a sub-cellular level of organization.

Bibliography.

[1] Astwood, E. B.: J. Amer. Med. Assoc. **122**, 78 (1943). — [2] Astwood, E. B.: J. of Pharmacol. **78**, 79 (1943). — [3] Astwood, et al.: Endocrinology **32**, 210 (1943). — [4] Cruz Coke, et al.: Bol. Soc. biol. Santiago **4**, 14 (1947). [5] Denny, F. E.: Contributions of the Boyce Thompson Institute **7**, 55 (1935). — [6] Franklin, et al.: J. B. C. **151**, 191 (1943). — [7] Franklin, et al.: J. B. C. **153**, 151 (1944). — [8] Keston, et al.: J. B. C. **152**, 241 (1944). — [9] Mackenzie, C. J., and J. B.: Endocrinology **32**, 185 (1943). — [10] Williamson, Martin B.: Food. Res., Champaign **9**, 298 (1944).

Prof. L. Corsan Reid, M. D. N. Y. V. — Post Graduate Medical School, 477 First Avenue, New York City, N.Y., USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 469—472 (1953).

From the Department of Pharmacology, Yale University School of Medicine, New Haven, Conn., U.S.A. (Chairman: The late Professor William T. Salter).

Changes in uterine venous oxygenation during pregnancy in the rabbit*.

By

Desmond D. Bonnycastle.

With 2 figures in the text.

(Eingegangen am 2. März 1953.)

During the course of studies examining the actions of analgetic compounds, it was felt that observations on the ability of these materials to cause fetal respiratory depression would be of value. Therefore, an attempt was made to establish a procedure which would be relatively easy to carry out in order to determine the action of such compounds, and as a logical starting point the determination of the effect of such materials upon the degree of oxygenation of uterine venous blood in the rabbit was made. The only complete study of the oxygenation of uterine venous blood in the rabbit during pregnancy is that of Barcroft et al.[1]. This study while reporting a steady decrease in oxygenation of the uterine venous blood from the fifteenth or sixteenth day of pregnancy on up until term, suffers in one respect at least, in that the experiments were carried out under Dial anesthesia. It was felt, therefore, that it would be necessary to repeat this normal study of the changes occuring during pregnancy in uterine venous blood oxygenation under a less depressant type of anesthetic in order to establish a suitable baseline for future work. The subject of this short paper is the presentation of the results of this study.

Procedure.

Some twenty-five female rabbits weighing 4—7 kg. were used, and consisted of normal non-pregnant animals, and animals at all stages of gestation up to parturition and the few days following.

Spinal anesthesia (Bieter et al.[2]) was induced by the use of 0.25—0.5 ml. of percaine (1:500—1:1000) which resulted in a motor and sensory block up to mid-abdominal levels, which persisted as a rule for some sixty minutes.

Laparotomy was performed under aseptic conditions, and blood samples were taken from the femoral vein and artery and from the uterine vein. In most cases the wound was closed following the taking of samples and the animal re-examined at a later date. However, rabbits in the later stages of pregnancy (from the 27th day on) were likely to abort following this operative procedure, while at an early stage of pregnancy (prior to the 18th day), death of the feti and subsequent reabsorption frequently was the result.

* In honor of Prof. O. Loewi on his 80th birthday.

The blood samples were taken in oiled syringes containing a small amount of heparin, and were analyzed immediately for their oxygen, carbon dioxide and nitrogen content by the VAN SLYKE technique (PETERS and VAN SLYKE[5]). Hemoglobin levels were determined by the procedure of EVELYN and MALLOY[3, 4].

Results.

The results obtained are most clearly shown in a graphic form and Fig. 1 presents a plotting of the mean desaturation determined for both the uterine venous samples and the femoral venous samples and the carbon dioxide values for the uterine venous blood. These desaturation values were obtained by subtracting the percentage saturation of a particular venous sample from that of the arterial sample. The differences in the volumes percent carbon dioxide between the arterial and uterine venous samples are the values plotted in Fig. 1 for carbon dioxide.

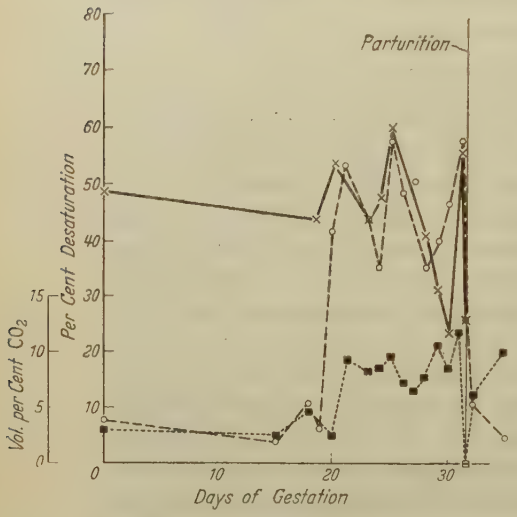


Fig. 1. Changes in oxygenation of femoral and uterine venous blood, and in the uterine venous carbon dioxide in the rabbit during pregnancy. — Solid line: femoral venous blood desaturation; broken line: uterine venous blood desaturation; dotted line: volumes percent carbon dioxide, uterine venous blood.

It will be noted in Fig. 1 that there is no marked alteration in uterine blood desaturation up until the 18th—20th day of pregnancy, while after this time the degree of desaturation increases sharply and this increased level is fairly well maintained until the onset of parturition when the oxygen saturation of the uterine blood returns rapidly to the pre-pregnant level.

No marked changes were noted in the degree of desaturation of the femoral venous blood with the exception of fluctuations in the latter part of pregnancy. These changes appeared to correspond with changes noted in the oxygenation of the uterine venous blood, with the possible exception of a marked decrease in femoral venous blood desaturation noted just prior to parturition. There was a considerable difference in the degree of desaturation of the femoral venous blood and uterine venous blood, a difference of some 40 percent up until the 19th—20th day of gestation, but after this time, there is little difference noted until the onset of parturition.

Some of the irregularity in these results might be in part a reflection of differences between the animals, since in the animals allowed to proceed to term, it was noted that parturition while occurring most

commonly on the 31st day of pregnancy, did on occasion occur as early as the 29th and as late as the 34th day.

The changes observed in the uterine venous blood carbon dioxide content are of some interest since they are observed at the time when it is known that an increase in the uterine metabolism takes place.

Spinal anesthesia was chosen for this type of work since it has been reported by SCHUBERTH[6] that spinal anesthesia exerts little effect upon the oxygenation of arterial blood. In order to illustrate that this was generally the case, when the level of anesthesia was kept to a mid-abdominal level, the following representative figures are presented:

State of animal	Arterial blood percent saturation	Hemoglobin
normal	99	10.45
normal	100.4	10.64
23rd day of pregnancy	98.2	10.80
24th day of pregnancy	100.6	9.17
28th day of pregnancy	100.0	12.60
30th day of pregnancy	98.6	11.50

Discussion.

The findings reported here may at first to appear be at variance with those of BARCROFT et al.[1] with respect to the desaturation of uterine venous blood during pregnancy in the rabbit. However, if the figures reported by BARCROFT are treated in the same manner as are those in this report, it will be seen that there is a great similarity in the two sets of results (Fig. 2). As in the present findings, the increase in desaturation of uterine venous blood becomes really marked about the 19th day to the 20th day and reaches a peak near parturition; also the differences between the peak desaturation values and those values which are present before the 20th day are approximately the same.

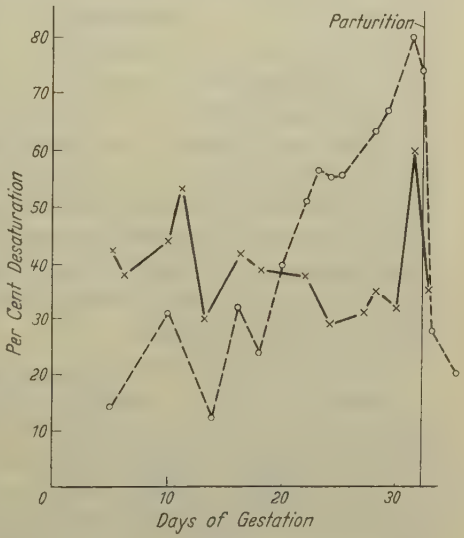


Fig. 2. (After BARCROFT). Changes in oxygenation of uterine venous blood from pregnant and non-pregnant uterine horns in the rabbit. — Solid line: non-pregnant side; broken line: pregnant side.

There are, however, two main differences. First, in Barcroft's[1] study there was a steady increase in desaturation determined from the 19th—20th day up until parturition, while in the present study the desaturation increased rapidly on the 19th—20th day and was maintained at a more or less high level of desaturation until parturition. The second point upon which there is a marked difference, is that the basal level of desaturation, i.e. before the 20th day, is considerably higher than that noted in this present study. In Fig. 2 the plotting representing the venous blood from a non-pregnant horn is seen to be at level of desaturation comparable to that of the femoral venous blood in Fig. 1. Since in Fig. 1 the values for non-pregnant uterine blood indicate here little desaturation, the differences in the two sets of data is further emphasized. One obvious explanation can be that Barcroft's study was carried out under Dial anesthesia which could have caused a depression of arterial oxygen saturation.

The changes observed in carbon dioxide levels require little comment, since it is likely that they represent the increase in uterine metabolism which becomes especially evident following the 16th—19th day of gestation in the rabbit.

This work was aided in part by a grant from the Fluid Research Fund of the Yale University School of Medicine.

Appreciation is expressed to Professor D. H. Barron for advice and criticism.

Summary and Conclusions.

An examination of the degree of oxygenation of the uterine venous blood of the rabbit at several stages of pregnancy has been carried out under spinal anesthesia.

It has been observed that there is little change from the non-pregnant level of oxygenation of the uterine venous blood up until the 18th—19th day of pregnancy, when a marked increase in desaturation is observed. This decrease in oxygenation persists until parturition when the level of oxygenation returns rapidly to pre-pregnant levels.

The similarities and dissimilarities between these results and those of Barcroft are discussed.

Bibliography.

[1] Barcroft, J., L. B. Flexner, W. Herkel, E. F. McCarthy and T. McClurkin: J. of Physiol. **83**, 215 (1934—35). — [2] Bieter, R. N., R. W. Cunningham, O. Lenz and J. J. McNearney: J. of Pharmacol. **57**, 221 (1936). — [3] Evelyn, K. A.: J. of Biol. Chem. **115**, 63 (1936). — [4] Evelyn, I. A., and H. T. Malloy: J. of Biol. Chem. **126**, 665 (1938). — [5] Peters, J. P., and D. D. van Slyke: Quantitative Clinical Chemistry Vol. II Methods. Baltimore: The Williams and Wilkins Company 1932. — [6] Schuberth, O. O.: Acta chir. scand. (Stockh.) **78**, Supp. 43 (1936).

Dr. Desmond D. Bonnycastle, Department of Pharmacology, Yale University, New Haven, Conn., USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 473—484 (1953).

From the Agnes Barr Chase Foundation for Cancer Research, Temple University School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.

A Relatively Rapid and Brief Method of Extracting Leukotaxine from Inflammatory Exudates*.

By

VALY MENKIN.

With 5 figures in the text.

(Eingegangen am 2. März 1953.)

The presence of a permeability factor in inflammatory exudates was demonstrated by the writer in 1936[14]. In 1937, the permeability factor was also observed to induce the local migration of polymorphonuclear leukocytes[1,2]. This factor was subsequently purified and shown to be diffusible when inflammatory exudates were dialyzed against distilled water[14, 15]. Its liberation by injured cells offers a reasonable explanation for two of the basic sequences in a developing inflammation; namely the initial increase in capillary permeability and the diapedesis of leukocytes into the inflamed area. It has been termed *leukotaxine*[19]. So much for a brief summary of the recovery of leukotaxine from exudates. The reader is referred to 2 monographs where the properties of leukotaxine are discussed in greater details[11, 18]. Numerous investigators have confirmed the presence of leukotaxine[1, 25]. Some have questioned the presence of leukotaxine in normal tissues[22]. The writer has pointed out that leukotaxine is only recovered from injured cells. For instance, if muscle tissue is severely injured, leukotaxine or a leukotaxine like substance can be readly recovered[21]. Practically anything that is done to cells injures them and liberates leukotaxine. For this reason, the best control for its presence in exudates, is its absence in normal unhemolyzed blood serum[10, 15]. Leukotaxine appears to be a polypeptide with a possible prosthetic group, the nature of which is unknown[5, 11]. Is leukotaxine a single substance or is there a separate permeability and a chemotactic factor? The presence of two distinct substances remains a possibility. This was pointed out by the writer in 1938[16]. Thus far, no one has been able to dissociate these two separate substances from inflammatory exudates. Spector, proceeding further with the original observations of the writer[17] and those or DUTHIE and CHAIN[2], claims to have dissociated from a fibrin digest the permeability from the chemotactic factor; but this investigator makes no comment concerning any

* In honor of Prof. O. LOEWI on his 80th birthday.

such dissociation from inflammatory exudates[26] and therefore any inferences drawn from this study would be based on an analogy that an enzymatic product of a protein is exactly similar to leukotaxine recovered from an inflammatory exudate. It is true that the writer has frequently noticed that potent leukotaxine, on standing for a prolonged interval maintains its permeability activity while its chemotactic property deteriorates. This, of course, does not mean necessarily the dissociation of two separate substances, but may perhaps merely refer to the greater instability of the group in the leukotaxine molecule responsible for chemotaxis.

In the present brief communication, the writer is presenting a new and relatively rapid method of obtaining leukotaxine. He also shows that the final product can be obtained as a crystalline fraction. Whether the occasional activity of the residual and amorphous material after separation of the active crystalline fraction is referable to an active amorphous phase of leukotaxine, or whether it is due to the persistent close association of a few crystals of leukotaxine with the amorphous particles, remains still a problematic question.

Experimental.

In brief, the method of extraction consists in obtaining exudate from the pleural cavity of dogs injected, as described previously, with 1.5 cc of turpentine into the right chest cavity[6]. On the following day, exudative material is obtained which is at an alkaline p_H. It is not as yet clear why one animal induces a profuse exudation, while another dog yields almost nothing. Perhaps the degree of developing lymphatic blockade at the site of inflammation has something to do with these individual differences. The proteins are precipitated out by treatment, first with dioxan and subsequently with acetone. The acetone supernatant is dried *in vacuo* and is treated with N acetic acid. The final product may be subjected to prolonged dialysis and crystals of leukotaxine are thus obtained. The amorphous residual fraction appears at times to have likewise some activity; but it is questionable whether this is the effect of the amorphous material, or whether there still may be some crystals in close association with the amorphous fraction. Few crystals in conjunction with the amorphous particles have been observed. It is conceivable that the duration of dialysis is insufficient or that some crystals reversibly penetrate into the cellophane tube. The scheme of extraction appears in the accompanying chart. I. Not only is the method simple, but it is both rapid and brief. In about two days, a sufficient amount of active material can be recovered from the exudate. The effect of leukotaxine obtained by this scheme is tested first for increased capillary permeability by suspending the material in 0.5 cc of physiolo-

gical saline and injecting either the mixture or the saline washings intracutaneously in the abdominal region of a shaven rabbit. This is followed by the intravenous injection of about 6 cc of 1% trypan blue in saline; approximately 1 hour later the cutaneous areas are excised and placed in 10% formaldehyde for subsequent microscopic examination.

Table 1. *Effect of Leukotaxine by N Acetic Acid Method on Capillary Permeability and on the Migration of Leukocytes.*

Rabbit No.	Accumulation of trypan blue in cutaneous areas treated with:		Chemotactic response in cutaneous areas treated with:	
	N Ac Leukotaxine	Physiological Saline	N Ac Leukotaxine	Physiological Saline
2065	3+	0	trace	0
	3+		active	
2066	+ at periphery			
2071	4+	0		
2072*	2+ to 3+	0	active	0
2073*	3+	essentially 0	active	0
2067	2+ to 3+			
	2+	0		
2074**	2+	0	moderate	0
2075**	2+	0	trace	0
2077***	2+	trace	active	0
2078	2+		very active	0
	2+ to 3+	trace	active	
	2+ to 3+		active	

* Leukotaxine dried in a dessicator before suspending in physiological saline for injection.

** Lyophilized N Ac leukotaxine suspended in physiological saline.

*** The skin areas were excised from 13 to 16 minutes following the administration N Ac leukotaxine.

The number of „plus" signs refers to the intensity of tissue staining by the dye accumulating from the blood stream.

The results are assembled in Table 1. It is clear that the vital stain penetrates from the circulating blood into the leukotaxine treated cutaneous areas in appreciable quantity. Fig. 1 shows the accumulation of the dye from the blood stream in the cutaneous area injected with lyophilized leukotaxine in saline. The accumulation of trypan blue in the upper skin area has occured to the extent shown within 25 minutes. About 1 hour later the skin area was excised and fixed. Microscopic examination revealed moderate chemotactic activity (rabbit 2074, Table 1). Physiological saline *per se* is wholly inactive (Table 1, fig. 1). The data definitely shows that the leukotaxine obtained by the new method favors an increase in capillary permeability as judged by the local accumulation of dye (Table 1). Microscopic examination likewise reveals leukocytic migration. Margination of polymorphonuclear leuko-

cytes is a conspicuous feature (fig. 2). In brief, the particular fraction of leukotaxine has, as in previous forms of leukotaxine, displayed the capacity to increase capillary permeability and to induce leukocytic migration.

When this amorphous-looking fraction of leukotaxine is dialyzed for 18 hours or so by constantly stirring the dialyzing tube against distillied

Fig. 1. The effect of increased capillary permeability induced by leukotaxine extracted by the N acetic acid method. *The upper area* shows the accumulation of trypan blue from the circulating blood 25 minutes following the cutaneous injection of lyophilized leukotaxine suspended in saline. 0.55 cc of the saline washings were injected into the skin. The accumulation of dye is conspicuous. *The lower area* shows the complete absence of any effect on the permeability of capillaries when 0.5 cc of saline is introduced into the skin. Rabbit 2074.

water, by attaching the tube to a stirring apparatus, it is found upon concentration of the diffusate to consist primarily of doubly refractile granular crystalline particles. These crystals induce an increase in capillary permeability and leukocytic migration (Table 2). Fig. 3 illus-

trates the reaction elicited by the crystals. There is an abundance of leukocytes in the lumen of small vessels as the cells migrate outward. The residual material in the cellophane tube contains primarily amor-

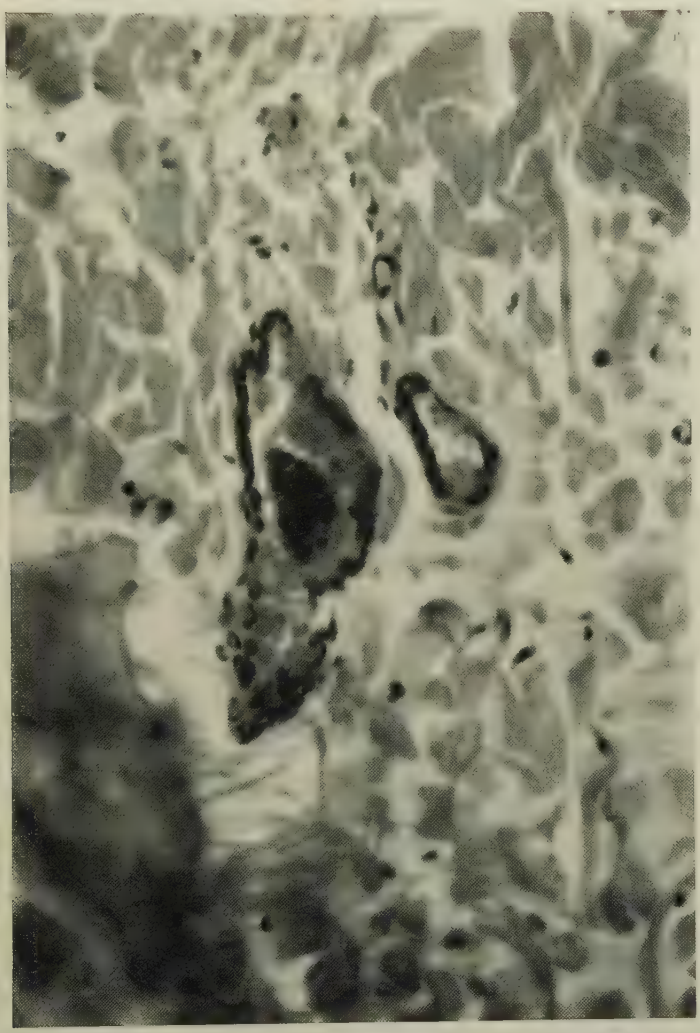


Fig. 2. The chemotactic response induced by leukotaxine extracted by the N acetic acid method. The inflammation is of about 1 hour duration. Note the striking margination of leukocytes along the wall of small blood vessels. X400. Rabbit 2088.

phous material. This material likewise induce an increase in capillary permeability, and in only half the cases studied, the migration of leukocytes (Table 2). It is to be recalled in this connection that other polypep-

tides are incapable of causing both an increase in capillary permeability and leukocytic migration[11]. Fig. 4 also illustrates the chemotactic response obtained at times with the residual material. Are there two forms of leukotaxine, namely an amorphous and a crystalline form? It is to be recalled that although the writer has obtained leukotaxine in a

Table 2. *The Effect of the Diffusate and of the Residual Fraction of N Acetic Acid Leukotaxine on Capillary Permeability and on the Migration of Leukocytes.*

Rabbit Number and identification of skin area	Accumulation of trypan blue in cutaneous areas treated with:		Chemotactic response in cutaneous areas treated with:	
	Diffusate of N Ac leukotaxine	Residual of N Ac leukotaxine	Diffusate of N Ac leukotaxine	Residual of N Ac leukotaxine
2123 A	—	4+	—	active
B	—	3+	—	active
C	2+ at periphery	—	—	—
D	3+	—	active	—
E	3+ at periphery	—	mild	—
F	2+	—	very active	—
2100 A	4+	—	moderate	—
B	—	2+ at periphery	—	Essentially negative
2101 A	4+	—	moderate	—
B	—	3+	—	trace
2102 A	3+	—	active	—
B	—	3+	—	inactive
C	0	—	inactive	—
D	—	+ at periphery	—	inactive

crystalline form[5], this has not always been the case. CULLUMBINE and RYDON, who confirmed leukotaxine[1], have not obtained the material in such crystalline state. MORIMOTO, in Japan, on the other hand, has obtained needle-like crystals of leukotaxine as originally described by the writer[23]. It is possible that the divergent methods utilized by various investigators have yielded leukotaxine in either amorphous or the crystalline form. However, one cannot be absolutely certain of the existence of these two forms, for it is possible that insufficient dialysis or the matter of ionic equilibration in the presence of indiffusible material causes a few active crystals of leukotaxine to remain behind alongside with the amorphous material. This has actually been observed. Therefore, the point needs further verification, and at present the writer is engaged in studying the question of whether or not there are two forms of leukotaxine.

In 1940, the writer described experiments showing that the extract of the adrenal cortex represses the increased capillary permeability induced either by an exudate or its contained leukotaxine[7]. In 1942, similar observations were made

with Compound *E* or cortisone[20]. These obtained facts were the first demonstration of the anti-inflammatory property of whole adrenal cortical extract and of cortisone. This work has amply been confirmed[3, 24]. In 1949 KENDALL and HENCH with their collaborators showed in a brilliant way the therapeutic application of cortisone and of ACTH in rheumatoid arthritic patients[4]. The work of these last investigators stimulated the writer to renew his original studies on the anti-inflammatory property of cortisone. Curiously enough, although the original studies on the inhibitory capacity of adrenal cortical extract and of Compound *E* could readily

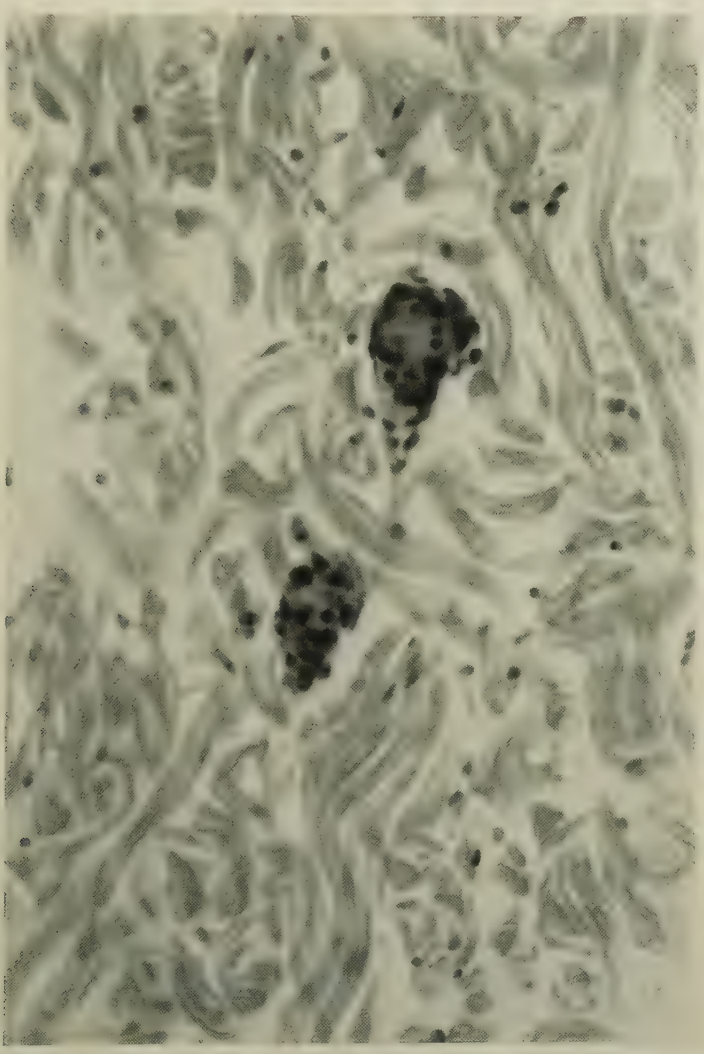


Fig. 3. Effect of the crystals of N Ac leukotaxine on leukocytic migration following prolonged dialysis of leukotaxine obtained by the N acetic acid method. The duration of inflammation is of about 1 hour. Note the two small vessels with numerous leukocytes in their lumen as these cells migrate into the extracapillary spaces. X 400 Rabbit 2123.

be confirmed with alkaline exudates, the suppressing effect of either adrenal cortical extract or cortisone could not be elicited when an acid exudate was utilized[8]. In other words, it was found that the increased capillary permeabilitiy was referable in the early stages of inflammation to the liberation of *leukotaxine*; but in the later phase of an acute inflammation when the hydrogen ion concentration is high and therefore an acid p_H results, the seepage of fluid through the capillary wall was due primarily to another factor, termed by the writer *exudin*. Exudin was found to be repressed by ACTH but not by cortisone[9]. The effect of ACTH on exudin is a direct

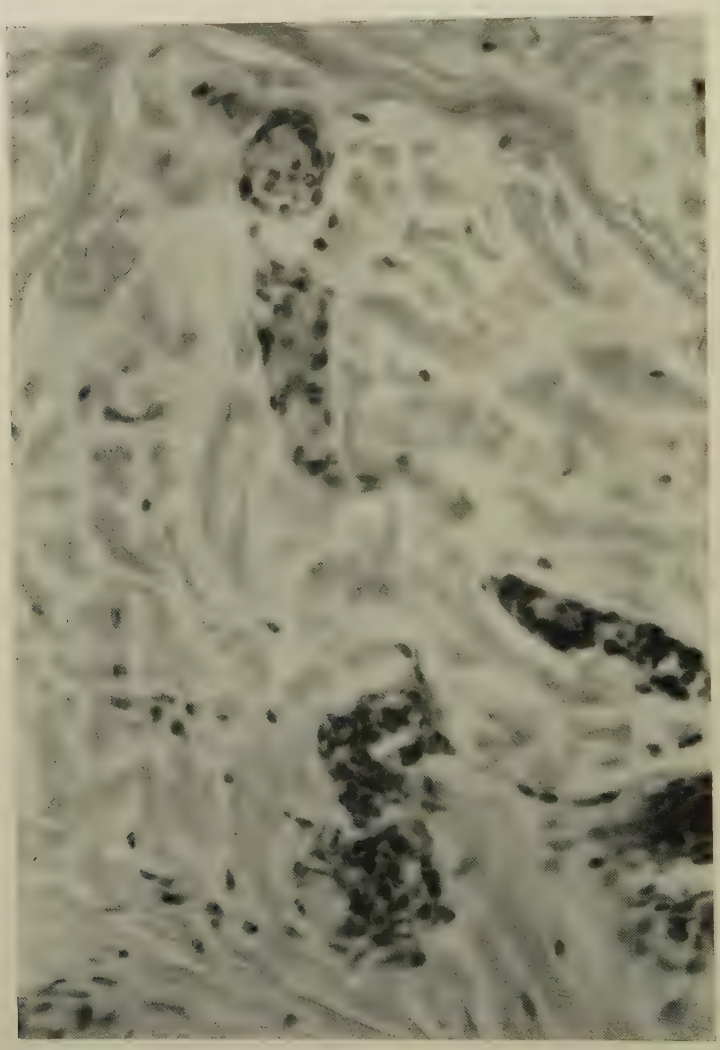


Fig.4. The possiblity of an amorphous phase of N Ac leukotaxine. The residual fraction after prolonged dialysis and diffusion outward of the active crystals of leukotaxine. Note the lumen of small vessels crowded with leukocytes induced presumably by the amorphous particles of leukotaxine. The duration of inflammation is about 1 hour. X400 Rabbit 2123.

one without the necessity of the adrenals since it also occurs in adrenalectomized rats[13].

In the following few experiments, data are recorded showing that Compound F mixed with the fraction of leukotaxine, extracted as described above, likewise suppresses the increased capillary permeability and to some extent the diapedesis of polymorphonuclear leukocytes (Table 3). The experiments were of shorter duration lasting for about 20 minutes to almost 1 hour. Compound F in doses of approximately 3 mg. were suspended with an indeterminate amount of N acetic acid leukotaxine and left standing for approximately 15 to 20 minutes mixed

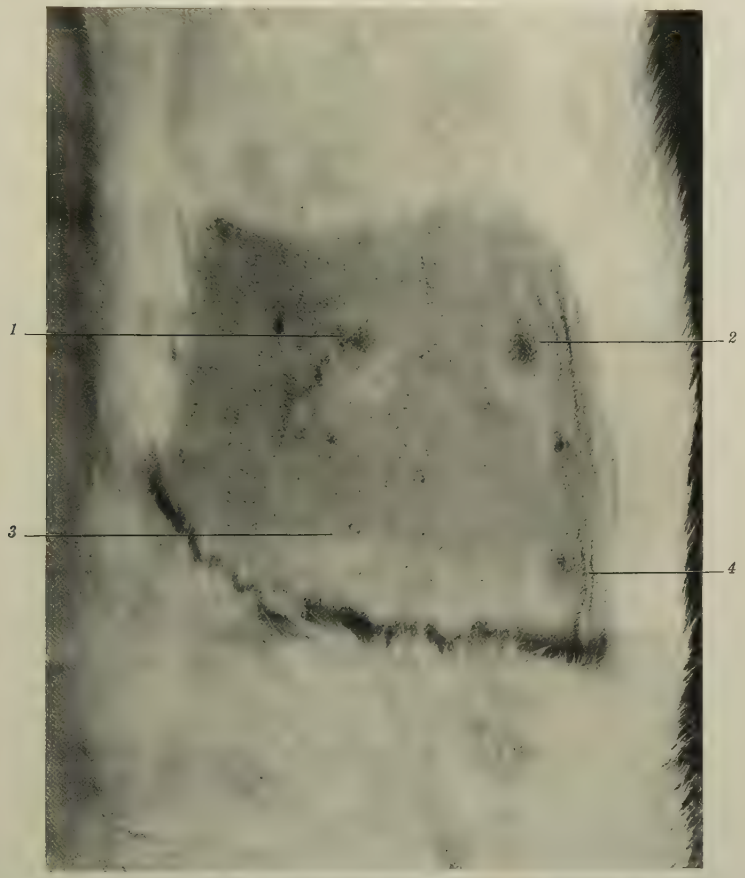


Fig. 5. The suppression of the Increased capillary permeability induced by N Ac leukotaxine when in contact Compound F. 2.5 mg. of Compound F mixed with 0.5 cc of N Ac leukotaxine in saline are allowed to stand for about 17 minutes before intracutaneous injection. Note the suppression of the increased capillary permeability (cf. areas 3 and 4). Exudin in contact with Compond F is not appreciably affected in its capacity to increase capillary permeability (cf. areas 1 and 2; 1 is the skin area containing exudin and Compound F; whereas area 2 is the control skin area with exudin alone). Rabbit 2095.

Table 3. *Effect of Compound F (17-hydroxycorticosterone) in Suppressing the Increased Capillary Permeability Induced by N Ac Leukotaxine.*

Rabbit No.	Amount of Cpd F mixed with leukotaxine Mg.	Duration of Inflammation mins.	Accumulation of trypan blue in skin areas treated with:		Chemotactic response in areas treated with:	
			N Ac leukotaxine + Cpd F	N Ac leukotaxine	N Ac leukotaxine + Cpd F	N Ac leukotaxine
2093	3.5	20	+ to 2+	2+ to 3+	trace	very active
2096	3.3	23	0	2+	trace	mild
2095	2.5	57	0	2+ to 3+	mild	very active

together prior to the intracutaneous injection. As controls, the same amount of leukotaxine from the same suspension was utilized. It is clear that Compound F just as in the case of cortisone[20] tends to suppress both the increased capillary permeability and the local chemotactic response. The effect on capillary permeability is illustrated in fig. 5 (cr. areas 3 and 4, Rabbit 2095). In this photograph one also observes the inability of Compound F to suppress the increase in capillary permeability induced by exudin. Therefore, this particular observation is similar to the absence of effect on the part of cortisone on exudin[8]. In a recent experiment 11 mgs. of cortisone *per se* suspended in saline was likewise shown to restrain the increase in capillary permeability and the migration of leukocytes. This indicates that the same effect on inflammation can be elicited with pure cortisone as with commercial cortisone acetate[8].

Summary and Conclusions.

A new and rapid method of obtaining leukotaxine is described. It consists in precipitating out the proteins of an inflammatory exudate when the latter is usually at an alkaline p_H. This is accomplished with dioxan and acetone. The acetone supernatant fraction is evaporated to dryness *in vacuo* and treated with N acetid acid. An amorphous active fraction results. There is a considerable amount of interspersed crystalline material. The latter can be dialyzed out and shown to be active in inducing both an increase in capillary permeability and local leukocytic migration. Whether or not the amorphous material remaining in the cellophane tube has any leukotaxine activity is still not clearly defined; and that phase of the work is being studied further.

The fraction of leukotaxine tends to be suppressed by Compound F in inducing an increase in capillary permeability and the local migration of leukocytes. This, therefore, is similar to the action of cortisone on leukotaxine[8, 20]. In an as yet unpublished study, it is shown that Compound F repedelly injected directly into an inflamed area seems likewise to prevent the formation of leukotaxine in an inflamed area or at least inhibits its

effects on both the capillary wall and on diapedesis[12, 13]. Since leukotaxine is presumably formed by the injured cell[18], this observation would indicate that the anti-inflammatory mechanism is probably at a cellular level.

Chart 1. Valy Menkin, 1953.

Leukotaxine (New scheme of extraction).

50 cc exudate (usually at an alkaline p_H)
↓
Dioxan (1:1)
↓
Stir for 1 hour
↓
Centrifuge
↓
Supernatant
↓
Acetone (1:1)
↓
Centrifuge
↓
Evaporated Supernatant to dryness *in vacuo* at about 50° C
↓
*25 cc of N acetic acid
↓
On ice for about 1 day or longer
↓
Centrifuge
↓
Wash precipitate with distilled water by stirring and subsequent centrifugalization
↓ (repeat procedure twice)
Precipitate contains leukotaxine in amorphous state admixed with leukotaxine
↓ crystals
Add 5 cc distilled water to precipitate
↓
Dialyze 18 hours against 50 cc distilled water, stirring the dialyzing bag throughout
↓ the dialysis
Concentrate diffusate *in vacuo* at ± 50° C.
↓
Active doubly refractile crystalline leukotaxine.

* It has been found that addition to the N acetic acid fraction of an equal volume of 10% Ferric chloride with subsequent maintenance on ice for several weeks, yields a number of brownish and other doubly refractile crystals which seem active in increasing local capillary permeability.

It is with pleasure that the writer wishes to express his acknowledgment to Dr. W. Kalnins for assisting in the chemical preparation of the leukotaxine herewith described. He is also indebted to both Dr. E. S. Gault for taking the photomicrographs and to Miss Irene Goldman for the histological preparations.

Bibliography.

Cullumbine, H., and H. N. Rydon: Brit. J. Exper. Path. **27**, 33 (1946). — [2] Duthie, E. S., and E. Chain: Brit. J. Exper. Path. **20**, 417 (1939). — [3] Freed, S. C., and E. Lindner: Amer. J. Physiol. **134**, 258 (1941). — [4] Hench, P. S., E. C. Kendall, C. H. Slocumb and H. F. Polley: Proc. Staff Meet. Mayo Clin. **24**, 181 (1949). — [5] Menkin, Valy: Alexanders Colloid Chemistry **5**, 917 (1944), Reinhold Publishing Corporation, New York. — Menkin, Valy: Amer. J. Path. **10**, 193 (1934). — [7] Menkin, Valy: Amer. J. Physiol. **129**, 691 (1940). — [8] Menkin, Valy, Amer. J. Physiol. **166**, 509 (1951). — [9] Menkin, Valy: Amer. J. Physiol. **166**, 518 (1951). — [10] Menkin, Valy: Arch. of Path. **24**, 65 (1937). — [11] Menkin, Valy: Dynamics of Inflammation. New York: Macmillan Company 1940 (Reprinted 1950). — [12] Menkin, Valy: Fed. Proc. **2**, 98 (1953). — [13] Menkin, Valy: Internat. Arch. Allergy (Basel) **4**, 131 (1953). — [14] Menkin, Valy: J. of Exper. Med. **64**, 485 (1936). — [15] Menkin, Valy: J. of Exper. Med. **67**, 129 (1938). — [16] Menkin, Valy: J. of Exper. Med. **67**, 145 (1938). — [17] Menkin, Valy: J. of Exper. Med. **67**, 153 (1938). — [18] Menkin, Valy: Newer Concepts of Inflammation. Springfield, Illinois, USA: C. Thomas 1950. — [19] Menkin, Valy: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **36**, 164 (1937). — [20] Menkin, Valy: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **51**, 39 (1942). — [21] Menkin, Valy: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **80**, 223 (1952); Science (Lancaster, Pa.) **115**, 382 (1952). — [22] Moon, V. H., and Geo. A. Tershakovec: Arch. of Path. **52**, 369 (1951). — [23] Morimoto, M.: Personal Comunmication (1952), from Japan. — [24] Opsahl, J. C.: Yale J. Biol. a. Med. **21**, 255 (1949). — [25] Pasquali, L.: Ric. e studi d. Med. Speriment. **18**, 209 (1947)—. [26] Spector, W. G.: J. of Path. **63**, 93 (1951).

Dr. Valy Menkin, Temple University, Philadelphia, Pennsylvanien, USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 485—490 (1953).

Versuche zur Calcium-Proteinbindung im Blutserum*.

Von

W. Minder und T. Gordonoff.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. Februar 1953.)

Das radioaktive Calcium-Isotop Ca^{45} erlaubt die Untersuchung von Problemen, bei denen zwischen schon vorhandenem und neu zugefügtem Ca unterschieden werden muß, und es gelingt auf relativ einfache Weise, die Wege quantitativ zu verfolgen, die dieses Element nach Zufuhr im Körper nimmt, da die radioaktiven Eigenschaften dieses Isotops als fast ideal anzusprechen sind.

In einer früheren Versuchsreihe wurde gefunden[5], daß in die Blutbahn von Kaninchen injiziertes Ca^{45} in Form von wäßrigen Ca-„Lactobionat"-Lösungen ($Ca(C_{12}H_{21}O_{12})_2$) sehr rasch aus dem Blutkreislauf wieder verschwindet, wobei zwei deutlich getrennte Abfuhrgeschwindigkeiten festgestellt werden konnten. Etwa $^2/_3$ der „in physiologischen Konzentrationen" zugeführten Ca-Menge verbleiben dabei im Mittel nur ca. 3,6 min in der Blutbahn, während das restliche Drittel erst nach ziemlich genau 2 Std weggeführt worden ist. Weiter konnte gezeigt werden, daß unter diesen Umständen das dem Blut zugesetzte Ca^{45} durch Alkoholfällung der Proteine praktisch quantitativ mit ausgefällt werden kann, wobei die Genauigkeit der Ca-Bestimmung im Filtrat weit unter 1% lag. Diese Versuche sprechen sehr zugunsten der Theorie der „Vehikelfunktion" der Blutproteine für den Ca-Transport, wie sie von Bennhold[1], Rothlin[6], sowie von Klinke[3] und von Linneweh[4] aufgestellt worden ist.

Die wesentlich verschiedenen Abfuhrgeschwindigkeiten (exponentieller Konzentrationsabfall von Ca^{45} mit den Koeffizienten —0,28 und —0,0095 bei der Messung der Zeit in Minuten) ließen vermuten, daß beim Ca-Transport möglicherweise zwei verschiedene Bindungsarten an die Proteine beteiligt seien. Bei dem „normalen Ca-Spiegel" von 0,09—0,11 mg Ca/cm³ Serum werden etwa 52% als an die Albumine gebunden angenommen, während die restlichen 48% „diffusibel", z. T. in ionisierter Form sein sollen, wobei offenbar nur dieser Anteil für den eigentlichen, insbesondere den kurzzeitigen Ca-Transport verfügbar wäre.

Zu diesem Fragenkomplex haben wir in der letzten Zeit einige Versuche unternommen, über welche hier berichtet werden soll. Zunächst war die Frage abzuklären, wieviel Calcium überhaupt bei der Proteinfällung aus dem Serum mit Alkohol als „gebunden" in Erscheinung tritt. Wir sind uns dabei bewußt, daß diese Menge nicht dieselbe zu sein braucht, wie die „im Lebenden" gebundene, weil natürlich auch die Alkoholfällung einen „Milieuwechsel" des Systems Ca — Protein bewirken kann. Dieser ist aber ohne Zweifel relativ gering, verglichen mit

* Herrn Professor Dr. Otto Loewi zum 80. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

andern Fällungsmethoden, wie z. B. mit Trichloressigsäure. Da Ca-Laktobionat durch Alkohol weitgehend aus einer wäßrigen Lösung ausgefällt wird, wurden die Versuche mit wässerigen $CaCl_2$-Lösungen durchgeführt, welche in den verwendeten Konzentrationsgebieten durch die Fällungsreaktion in keiner Weise beeinflußt werden. Menschlichem Blutserum wurden gleiche Mengen Ca^{45}-haltiger wässeriger $CaCl_2$-Lösungen verschiedener Konzentrationen zugesetzt und dieses Gemisch nach 1stündigem Stehen bei 37° C mit Alkohol gefällt. Nach 24 Std wurde der Niederschlag abfiltriert und die Filtrate auf Ca^{45} untersucht. Abb. 1 gibt die Ergebnisse von 3 verschiedenen Versuchsreihen wieder in den Konzentrationsgrenzen zwischen 0,04—10 mg Ca/cm³ Serum

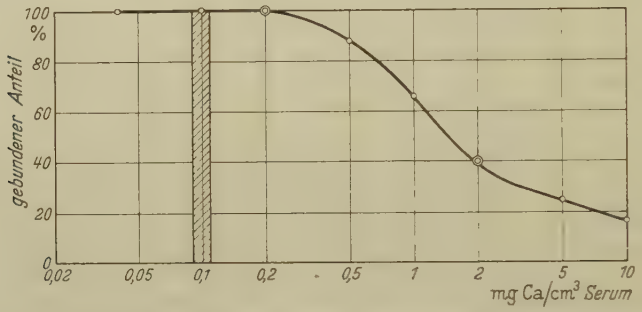


Abb. 1. Der bei der Proteinfällung mit Alkohol als gebunden in Erscheinung tretende Calciumanteil in Prozenten der Gesamt-Ca-Menge bei Variation der Konzentration. Doppelkreise: Mittel aus 6 Bestimmungen, Fehler ± 2%.

(zugesetzte Menge). Die verwendeten Ca-Konzentrationen variieren also zwischen etwa $^1/_3$ des „physiologischen" Wertes bis zu dessen 100fachem Betrag. Das schraffierte Gebiet stellt die Variationsbreite des „normalen Ca-Spiegels" dar. Es kann der Abbildung entnommen werden, daß bis zu einer Konzentration von 0,2 mg Ca/cm³ Serum die Fällung eine vollständige war, während bei steigenden Konzentrationen zunehmend höhere Ca^{45}-Aktivitäten im Filtrat gefunden wurden. Der gebundene prozentuale Anteil nimmt mit steigender Konzentration natürlich stark ab, ist aber seinem Absolutbetrag nach keineswegs konstant, sondern bei hohen Konzentrationen viel höher, als der sogenannte normale Ca-Spiegel. So ist er bei 0,5 mg Ca/cm³ Serum schon etwa 4,5fach, bei 2 mg/cm³ etwa 8fach und bei 10 mg/cm³ sogar 16fach höher als der Normalwert. Dabei war natürlich im verwendeten Serum schon eine normale Ca-Konzentration vorhanden.

Aus diesen Versuchen in Verbindung mit unseren früheren Ergebnissen[5] geht hervor, daß bei „physiologischen" Konzentrationen durch die Fällungsreaktion mit Alkohol kein Unterschied gemacht werden kann zwischen den beiden als „an die Albumine gebunden" und als

„diffusibel" bezeichneten Ca-Anteilen des Serums. Falls ein derartiger Unterschied besteht, so wird er durch den Alkoholzusatz vollständig verwischt, und auch der als „ionisiert" angesprochene Anteil findet sich nicht im Filtrat.

Um die Bindungs- und Ausbauverhältnisse genauer zu studieren, wurden 2 weitere Versuchsgruppen durchgeführt, wobei die Proteine einer Fraktionierung unterzogen wurden. In einer ersten Versuchsgruppe wurden einem Kaninchen 20 cm^3 einer Ca-Lactobionatlösung mit 8 mg Ca/cm^3 injiziert und dem Tier 5 min und 30 min nach der Injektion eine größere Blutmenge entnommen. Nach unseren früheren Ergebnissen müssen im 2. Fall etwa 70% der injizierten Menge schon wieder weggeführt worden sein, während im ersteren etwa 70% noch vorhanden sein müßten. Die beiden Sera wurden einer Fraktionierung nach Cohn[2] unterworfen und die Radioaktivität der einzelnen Protein-Fraktionen bestimmt. Die Ergebnissen dieser „in vivo"-Versuche sind in der folgenden Tabelle enthalten:

Tabelle 1. *Ca-Gehalt der Proteinfraktionen in µg Ca/mg Protein „in vivo"-Versuch.*

Fraktion	II + III	IV	V
5 min	1,24	2,05	1,25
30 min	1,30	0,64	0,37

Schließlich wurden noch 2 Versuche unternommen, bei denen das Ca^{45}-Lactobionat den einzelnen Fraktionen erst nach deren Trennung zugesetzt wurde. Hierbei wurden die Fraktionen als 3%ige Lösungen 72 Std gegen öfters ausgewechselte Ca-freie Ringer-Lösung dialysiert und den so vorbereiteten Lösungen pro 5 cm^3 je 0,1 cm^3 Ca^{45}-Lactobionat (Konzentration 8 mg Ca/cm^3) zugesetzt. Die Lösungen wurden durch Dialysenmembranen ultrafiltriert und hierauf in den Rückständen und in den praktisch eiweißfreien Filtraten die Radioaktivität gemessen. Diese „in vitro"-Versuche sollten Aufschluß über das Verhältnis der Bindungsfähigkeiten der einzelnen Protein-Fraktionen geben, und gleichzeitig sollten sie zur Kontrolle der „in vivo"-Versuche dienen. Die folgende Tabelle enthält die entsprechenden Ergebnisse.

Den beiden Tabellen kann zunächst das bemerkenswerte Resultat entnommen werden, daß die an die Fraktionen IV und V gebundenen

Tabelle 2. *Ca-Gehalt der Proteinfraktionen in µg Ca/mg Protein „in vitro"-Versuch.*

Fraktion	II + III	IV	V
Versuch 1	0,41	0,46	0,27
Versuch 2	0,64	0,94	0,40
Mittel	0,53	0,70	0,34

Ca-Mengen des 30 min-in vivo-Versuches und der beiden in vitro-Versuche sich nicht wesentlich unterscheiden, während für die Fraktion II + III die Mengen im Lebenden in beiden Versuchen 2—3mal höher sind. Beim 5 min-in vivo-Versuch enthalten die Fraktionen IV und V 3—4mal höhere Ca-Werte, als beim 30 min-Versuch und bei den in vitro-Versuchen.

Bemerkenswert sind die Verhältnisse des Ca-Gehaltes der verschiedenen Fraktionen untereinander:

Tabelle 3. *Verhältnisse des Ca-Gehaltes der Fraktionen.*

Fraktionsverhältnis	in vivo-Versuch		in vitro-Versuch	
	5 min	30 min	Versuch 1	Versuch 2
(II + III)/IV	0,60	2,03	0,89	0,68
IV/V	1,64	1,73	1,70	2,35

Mit Ausnahme des Verhältnisses (II — III) IV für den 30 min-in vivo-Versuch sind alle diese Verhältnisse von einer recht guten, teilweise iener überraschenden Konstanz. Die Verhältnisse zeigen zunächst durchwges, daß die Fraktion IV unter „anormalen" Verhältnissen (d. h. nach kurzer Zeit im Lebenden und bei nachträglicher Zugabe) pro Maßeinheit berechnet 60—80% mehr Calcium zu binden imstande ist, als die Fraktion II + III einerseits und V andererseits. Ebenso binden die Fraktionen IV und V im Lebenden kurze Zeit nach Injektion gut 3mal mehr Calcium als unter „normalen" Verhältnissen.

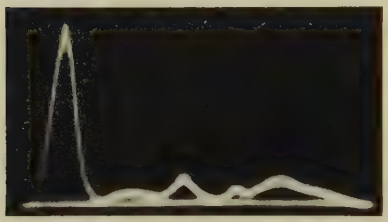


Abb. 2. Elektrophoresediagramm des verwendeten Kanichenserums.

Interessant erscheinen nun aber die vorstehenden Zahlenergebnisse in Verbindung mit den beiden Ausbaugeschwindigkeiten des Calciums aus dem Blut einerseits und mit dem relativen Mengenverhältnis der Proteine andererseits. Die Elektrophorese (Abb. 2) lieferte die folgende Zusammensetzung des Kaninchenserums:

Tabelle 4.

	Mensch Mittelwerte in % nach Tiselius (7)	Kaninchen in %
Fibrinogen	5	4,9
α-Globulin	11,8	7,0
β-Globulin	12,1	9,7
γ-Globulin	11,1	13,0
Albumine	60,0	65,4

Dabei besteht die Fraktion V aus fast reinem Albumin, die Fraktion II + III zu annähernd gleichen Teilen aus β- und γ-Globulin und die Fraktion IV enthält die Hauptmenge des α-Globulins. Der 30 min-in vivo-Versuch kann mit dem entsprechenden 5 min-Versuch und mit der Ausbaukurve des Calciums aus dem Blutserum am besten in Beziehung gesetzt werden, wenn man für die langfristige Komponente eine Bindung an die β- und γ-Globuline und teilweise an die Albumine annimmt und für die kurzfristige eine solche an die Albumine und besonders an das α-Globulin. Die in den Tabellen enthaltenen Zahlen erlauben sogar eine angenäherte Berechnung der aus der Ausbaukurve berechneten Anteile der verschiedenen Ausbaugeschwindigkeiten, wobei der nur kurzzeitig im Serum verbleibende Anteil zum größten Teil (etwa 90%) an die Albumine und zu einem kleinen Teil an das α-Globulin gebunden ist. Der langzeitig im Serum verbleibende Anteil dagegen ist zum größten Teil an das β- und γ-Globulin gebunden. Vom Gesamt-Ca-Gehalt der Albumine entfallen etwa 70% auf den kurzzeitigen und 30% auf den langzeitigen Anteil.

Es erscheint zum Schluß noch von einem gewissen Interesse, die in den vorstehenden Tabellen enthaltenen Ca-Werte mit den in Abb. 1 enthaltenen Verhältnissen zu vergleichen. Die normale Variationsbreite des Proteingehaltes des Serums wird zu 6,5—8%, im Mittel also zu etwa 70 mg/cm³ Serum angegeben. In den Fraktionierungsversuchen wurde als Maximalwert 2,05 μg/mg und als Minimalwert 0,27 μg Ca/mg Protein gefunden. Diese Ca-Gehalte betragen umgerechnet auf Serumwerte für den Maximalwert 0,144 mg Ca/cm³ Serum und für den Minimalwert 0,019 mg Ca/cm³ Serum. Sie liegen somit zwischen etwa $^1/_5$ und dem 1,5fachen Wert des „normalen Ca-Spiegels", also noch vollständig im Gebiet der nach Abb. 1 vollständigen Bindung. Es ist nun bemerkenswert, daß derartige zusätzliche Ca-Anteile durch die chemischen Manipulationen bei der Proteinfraktionierung nicht vom Eiweiß abgetrennt werden, obschon sie im Lebenden zum mindesten zu einem großen Teil als diffusibel angesehen werden müssen. Möglicherweise steht diese Erscheinung mit einer Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichts bei der Proteinfällung mit Alkohol in Zusammenhang.

Die Eiweißfraktionierungen wurden unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Nitschmann durch die Herren Dr. Mattenheimer und Dr. v. Tavel im Theodor Kocher-Institut vorgenommen. Wir sind diesen Herren hierfür, sowie für mancherlei Ratschläge sehr zu Dank verpflichtet.

Der Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der Universität Bern sind wir für Unterstützung sehr dankbar.

Zusammenfassung.

Bei der Untersuchung der Bindungsfähigkeit des Calciums im Serum (injiziert wurde das Ca^{45}) wurde festgestellt, daß etwa $^2/_3$ der zugeführten

Calciummenge im Mittel nur etwa 3,6 min in der Blutbahn bleiben, während $^1/_3$ erst nach 2 Std weggeführt wird.

Unsere Untersuchungen in vitro und in vivo lassen annehmen, daß das kurzfristig in der Blutbahn verweilende Calcium vorwiegend an die Albumine und an das α-Globulin, während das langfristig in der Blutbahn verweilende Calcium besonders an die β- und γ-Globuline gebunden werden.

Literatur.

[1] Bennhold, H.: Erg. inn. Med. **42**, 273 (1933). — [2] Cohn, E. J.: History of Plasma Fractionation 1947. — [3] Klinke, K.: Mineralstoffwechsel. Leipzig und Wien: Deuticke 1931. — [4] Linneweh, F.: Klin. Wschr. **18**, 353 (1939). — [5] Minder, W., u. T. Gordonoff: Experientia **8**, 71 (1952). — [6] Rothlin, E.: Viert.-Jahresschr. Naturforsch. Ges. Zürich **90**, 195 (1945). — [7] Tiselius, A.: Trans. Faraday Soc. **33**, 524 (1937).

Doz. Dr. W. Minder, Radiuminstitut, Bern.
Prof. Dr. T. Gordonoff, Bern, Freiburgstr. 30.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 491—501 (1953).

Aus dem Institut für klinische Chemie der Universität Edinburgh
(Vorstand: Dr. C. P. Stewart).

Zur Kenntnis der Histaminase* **.

Von
Regine Kapeller-Adler.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 26. Februar 1953.)

I. Einleitung.

Best entdeckte im Jahre 1929 die Histaminase und fand, daß dieses Enzym spezifisch sei für den Abbau des Histamins. Auf Grund ihrer Versuchsergebnisse stellten Zeller und seine Mitarbeiter [Zeller, 1938 (1), 1938 (2); Zeller, Birkhäuser, Mislin u. Wenk 1939; Zeller, Stern u. Wenk 1940] einige Jahre später die Behauptung auf, daß die Histaminase identisch sei mit der Diaminoxydase, welche nicht nur Histamin sondern auch andere Diamine, wie Cadaverin, Putrescin und Agmatin auf oxydativem Wege abbaue. Befunde, welche von uns in zahlreichen Untersuchungen der Histaminaseaktivität in menschlichen Gravidenseren und Plazenten sowie in Schweinenierenextrakten erhoben worden waren [Kapeller-Adler 1944, 1949, 1951 (1), 1952 (1), (3)] ließen jedoch die Behauptung Zellers bezüglich der Identität der Histaminase mit der Diaminoxydase zweifelhaft erscheinen.

So fanden wir unter anderem, daß die Histaminase von Schweinenierenpräparaten Histamin viel stärker als Cadaverin angreife, wogegen Gravidenserum- und Plazentarhistaminase Cadaverin zu einem weit größerem Ausmaße abbaue als Histamin.

Ferner sank nach erfolgter Dialyse die Wirkung von Histaminaselösungen gegenüber Histamin, stieg aber, wenn Cadaverin, Putrescin oder Agmatin als Substrate dienten. Weiter bewirkte der Zusatz einer Lösung von Flavinadenindinukleotid (FAD) — der prosthetischen Gruppe der Histaminase — zu dialysierten Histaminasepräparationen eine Steigerung des enzymatischen Abbaues des Histamins, hingegen eine Verminderung desjenigen von Cadaverin, Putrescin und Agmatin (Kapeller-Adler 1949). Schließlich konnte gezeigt werden, daß die natürlich vorkommenden oestrogenen Steroidhormone (Oestradiol, Oestron, Oestriol und Equilin) die Histaminaseaktivität gegenüber Histamin erhöhen, dagegen diejenige gegenüber Cadaverin herabsetzen. Hingegen üben die gonadotropen Hormone eine entgegengesetzte Wirkung aus, indem sie den enzymatischen Abbau des Histamins herabsetzen und denjenigen des Cadaverins fördern [Kapeller-Adler 1951 (2); 1952 (2)].

---

* Herrn Hofrat Prof. Dr. Otto Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

** Auszugsweise auf der Tagung der Biochemical Society am 21. März 1952 in London vorgetragen.

Die vorliegenden Untersuchungen dürften einen weiteren Beweis für die Behauptung liefern, daß die Histaminase nicht identisch sei mit der Diaminoxydase, sondern ein spezifisches Enzym für den Abbau des Histamins darstelle. Auf Grund der in dieser Arbeit erhobenen Befunde erscheint es sogar fraglich, ob selbst die Diaminoxydase ein einheitliches Enzym sei und ob nicht vielmehr für die einzelnen Diamine, wie Cadaverin, Putrescin, Agmatin, spezifische Enzyme existieren.

II. Durchführung der Versuche.

Als Ausgangsquellen für die enzymatischen Untersuchungen dienten Schweinenierenpräparate, Plazentarextrakte und Gravidensera.

Methoden.

Die Herstellung und Reinigung der Schweinenierenextrakte erfolgte entsprechend früheren Angaben (Kapeller-Adler 1949), die für die vorliegende Arbeit zum Teil modifiziert wurden. Die Rinde von 24 frischen Schweinenieren wurde in einem elektrischen Zerkleinerungsapparat zu einem dünnflüssigen Brei vermahlen, der Brei gewogen und mit der doppelten Menge einer 1% NaCl-Lösung vorsichtig unter ständigem Rühren bis zu 62° erhitzt. Filtration der warmen Lösung erfolgte durch einige große Faltenfilter (Whatman No. 12). Im klaren, gemessenen Filtrat (Rohextrakt, Fraktion A) wurde die enzymatische Wirkung auf Histamin, Cadaverin, Putrescin und Agmatin in Parallelversuchen untersucht. Das Filtrat wurde hierauf mit Ammonsulfat bis zur Erreichung einer 0,5 Sättigung gefällt. Der abfiltrierte Niederschlag wurde in 1000 ml destillierten Wassers gelöst und in aliquoten Teilen der tiefbraunen Lösung die Histaminasewirksamkeit bestimmt (Fraktion B). Diese Lösung wurde bis zur 0,5 Sättigung mit Ammonsulfat gefällt, der abfiltrierte Niederschlag in 300 ml destilierten Wassers gelöst und in aliquoten Teilen dieser Lösung (Fraktion C) die Histaminaseaktivität festgestellt. Die gesamte Histaminaseaktivität dieser Lösung wurde hierauf an Calciumphosphat-Gel[1] adsorbiert und das Gel abgenutscht. Das Gel wurde zweimal mit je 1000 ml Phosphatpufferlösung von p_H 7,2, welche Ammonsulfat von 0,3 Sättigung enthielt, eluiert und die vereinigten Auszüge mit Ammonsulfat bis zur 0,6 Sättigung versetzt. Der Niederschlag wurde in 100 ml destillierten Wassers gelöst (Fraktion D) und aliquote Teile davon auf Histaminaseaktivität geprüft. Die Lösung wurde erneut mit Ammonsulfat bis zur 0,6 Sättigung gefällt, der Niederschlag abgenutscht und im Vacuumexsiccator über $CaCl_2$ getrocknet. Aliquote Teile der feingepulverten Präparation (Fraktion E) wurden auf Histaminasewirksamkeit untersucht.

Bei der Herstellung von Plazentarextrakten hielten wir uns an die früher angegebene Methode [Kapeller-Adler, 1952, (3)].

Die Bestimmung der Histaminaseaktivität erfolgte hauptsächlich mittels der kürzlich veröffentlichten mikrovolumetrischen Methode [Kapeller-Adler, 1951 (1)]. Die Histaminaseaktivität wurde hierbei in Permanganateinheiten (Permanganate units, P.U.) ausgedrückt, wobei eine Permanganateinheit diejenige Enzymmenge darstellt, welche nach 24stündiger Inkubation in einer Sauerstoffatmosphäre bei einer Temperatur von 37° und einem p_H von 7,2 mit 1 mg Histaminchlorhydrat und einer wäßrigen Indigolösung 0,1 ml einer 0,002 N-$KMnO_4$-Lösung verbraucht. Diese Permanganateinheit (P.U.) entspricht einer Inaktivierung von 0,46 γ

[1] 700 ml einer 0,6 M $CaCl_2$-Lösung wurden mit 700 ml einer Lösung von 0,4 M $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$ gefällt, der Niederschlag abgenutscht und auf der Nutsche mit destilliertem Wasser alkalifrei gewaschen.

Histamin/Stunde. An Stelle von 1 mg Histaminchlorhydrat wurde in jeweiligen Experimenten je 1 mg von Cadaverin- oder Putrescinchlorhydrat oder Agmatinsulfat als Substrat verwendet.

Beispiel eines Ansatzes für eine Histaminaseaktivitätsbestimmung in Schweinenierenpräparaten, Plazentarextrakten und Gravidenseren. In einem Reagensglas wird 1 ml Plazentarextrakt bzw. Schweinenierenextrakt oder 1 ml nicht hämolysiertes Gravidenserum mit 4 ml Phosphatpuffer von p_H 7,2, 0,1 ml Substrat, enthaltend entweder 1 mg Histaminchlorhydrat oder 1 mg eines der oben genannten Substratsalze, 1 ml Indigolösung[1] und einem Tropfen Chloroform versetzt. Sauerstoff wird 1 min lang durchgeleitet, das Reagensglas mit Gummistopfen verschlossen, die Flüssigkeit durch Schütteln gut vermischt und 24 Std lang im Brutschrank bei 37° inkubiert. Eine Kontrolle (ohne Substratzusatz) wird ebenso behandelt. Nach 24 Std werden Kontrolle und Ansatz mit einer 0,002 N-$KMnO_4$-Lösung eben bis zum Verschwinden der blauen Farbe titriert.

Die Bestimmung der Histaminaseaktivität auf biologischem Wege erfolgte mittels der Methode von Anrep [1947 (1), (2)], die von uns geringfügig modifiziert worden war [Kapeller-Adler, 1951 (1)].

III. Ergebnisse.

1. Histaminaseaktivität in Schweinenierenpräparationen bei Anwendung verschiedener Substrate.

a) Rohextrakte. Die enzymatische Wirksamkeit dieser Extrakte auf Cadaverin, Putrescin und Agmatin wurde zu derjenigen auf Histamin in Beziehung gesetzt. Die Quotienten C/H, P/H und A/H geben das Verhältnis des Abbaues von Cadaverin, Putrescin und Agmatin zu demjenigen von Histamin an.

Tabelle 1. *Rohextrakte aus Schweinenieren (Fraktion A).* Enzymatischer Abbau von Cadaverin, Putrescin und Agmatin im Verhältnis zu demjenigen von Histamin.

Extrakt Nr.	C/H	P/H	A/H
E 16. . . .	0,87	0,29	0,11
E 17. . . .	0,84	0,08	0,07
E 18. . . .	0,75	0,13	0,04
E 19. . . .	0,94	0,25	0,14
Durchschn.:	0,85	0,19	0,09

C = Cadaverin; H = Histamin; P = Putrescin; A = Agmatin.

Tab. 1 zeigt die diesbezüglichen Resultate, welche in der Fraktion A von 4 verschiedenen Schweinenierenpräparationen gewonnen worden sind. Es fällt auf, daß vor allem die Werte für P/H und A/H von einem Rohextrakt zum anderen ziemlich stark schwankten.

b) Gereinigte Schweinenierenpulver. Aus der Tab. 2 ersieht man Resultate, welche in aliquoten Teilen von 4 verschiedenen, gereinigten

[1] 200 mg Indigocarmin werden in 300 ml destillierten Wassers gelöst und in einer braunen Flasche aufgehoben.

Schweinenierenpulvern (Fraktion E) erhalten worden waren. Nach erfolgter Reinigung der Rohextrakte wurden vollständig verschiedene Werte für C/H, P/H und A/H gewonnen. So wirkten die gereinigten Nierenpräparationen gar nicht mehr auf Agmatin ein, ferner bauten sie Cadaverin und Putrescin in weit geringerem Maße als die Rohextrakte

Tabelle 2. *Gereinigte Schweinenierenpräparationen (Fraktion E).*

Präparat Nr.	C/H	P/H	A/H
E 16. . . .	0,22	0,06	0
E 17. . . .	0,33	0,04	0
E 18. . . .	0,30	0,02	0
E 19. . . .	0,17	0,12	0
Durschchn.:	0,25	0,06	0

ab, was aus dem starken Absinken der Werte für C/H und P/H klar hervorgeht. Diese Beobachtung steht in Widerspruch mit Ergebnissen von Tabor (1951), welcher mit seiner Methode fand, daß der Wert für P/H in rohen Schweinenierenextrakten 1,1 betrug und nach Reinigung der Präparationen auf 3,7 stieg.

Tabelle 3. *Enzymatischer Abbau von Cadaverin, Putrescin und Agmatin im Verhältnis zu demjenigen von Histamin in verschiedenen Reinigungsstadien einer Schweinenierenpräparation.*

Fraktion	C/H	P/H	A/H
A	0,87	0,29	0,11
B	0,87	0,10	0,09
C	0,87	0,09	0,07
D	0,48	0,05	0
E	0,17	0,04	0

Diese Tabelle zeigt ein Beispiel für die Untersuchung des Abbaues von Cadaverin, Putrescin und Agmatin im Verhältnis zu dem des Histamins in den verschiedenen Fraktionen, die während der Reinigung von Nierenextrakten erhalten wurden. Aus den Resultaten ersieht man, daß nach der Adsorption der Histaminaseaktivität an Calciumphosphat-Gel und der darauffolgenden Eluierung der enzymatische Abbau von Agmatin völlig unterbunden worden ist und daß derjenige von Cadaverin und Putrescin im Verhältnis zu dem von Histamin sehr stark abgenommen hat. Die darauffolgende Reinigung der Fraktion führte zu einem noch stärkeren Absinken der Werte C/H und P/H (Fraktion E).

c) Untersuchung von Plazentarextrakten. In Tab. 4 sind die Resultate, die bei der Untersuchung von 10 verschiedenen Plazentarextrakten erhalten worden sind, zusammengefaßt. In Übereinstimmung mit früheren

Beobachtungen [Kapeller-Adler, 1952 (3)] bauten die Plazentarextrakte im Gegensatz zu Schweinenierenextrakten Cadaverin durchgehend viel stärker ab als Histamin. (Der Quotient C/H war immer größer als 1.) Weiterhin fällt es auf, daß die Werte für C/H, P/H und A/H in den einzelnen Plazentarextrakten ziemliche Schwankungen aufwiesen und daß die Durchschnittswerte für P/H und A/H in den Plazentarextrakten viel höher als die entsprechenden Werte in den Nierenpräparationen waren.

Tabelle 4. *Untersuchung von Plazentarextrakten.*

Nr.	C/H	P/H	A/H
1	1,74	0,48	0,31
2	1,46	0,71	0,52
3	1,36	0,60	0,16
4	1,64	0,63	0,51
5	1,46	0,60	0,43
6	1,64	0,47	0,30
7	1,22	0,57	0,32
8	1,95	0,59	0,50
9	1,81	0,65	0,36
10	1,68	0,38	0,26
Durchschn.:	1,59	0,57	0,37

Tab. 5 zeigt die Ergebnisse für den enzymatischen Abbau von Histamin und Cadaverin in Plazenten nach normalen und pathologischen Schwangerschaften. In 63 verschiedenen Plazenten wurde wieder, wie zu erwarten, eine stärkere Wirkung auf Cadaverin als auf Histamin gefunden. Der Quotient C/H blieb derselbe, ob die Plazenten zur Zeit oder

Tabelle 5. *Enzymatischer Abbau von Histamin und Cadaverin in Plazenten nach einer normalen und pathologischen Schwangerschaft.*

Anzahl von Plazent.	Substrat		C/H	Charakter d. Gravidität.
	Histamin P.U./Plaz.	Cadaverin P.U./Plaz.		
63	49,800 ± 10,700[1]	76,000 ± 22,600	1,53	Normal; termingemäße Geburt
14	40,960 ± 12,500	64,800 ± 28,700	1,58	Normal; vorzeitige Geburt
13	36,300 ± 16,000	60,360 ± 21,000	1,66	Normal; sectio Caes.
5	38,640 ± 6,100	75,680 ± 18,400	1,96	Leichte Toxämie
19	22,520 ± 7,840	52,650 ± 21,200	2,34	Schwere Toxämie
4	98,040 ± 12,042	134,500 ± 115,000	1,38	Zwillingsschwangerschaft
5	54,920 ± 30,300	95,580 ± 37,900	1,74	Zwillingsgravidität + Toxämie

[1] Die in dieser Tabelle angeführten P.U.-Zahlen (Permanganate units) sind Durchschnittswerte ± Standard Deviation einer Einzeluntersuchung.

vorzeitig geboren worden waren. Er war etwas höher als normal in Fällen von Kaiserschnitt. Auffallend waren die Ergebnisse in Toxämien. Schon in leichten Fällen von Präeklampsien war der Quotient viel höher als normal und stieg noch beträchtlich mehr in Plazenten nach schweren Toxämien an. Während der Zwillingsgravidität war der Quotient C/H etwas niedriger als normal, wurde aber, beträchtlich über die Norm, erhöht in Zwillingsschwangerschaften, die durch eine Toxämie kompliziert waren, gefunden.

d) Untersuchung von Gravidensera. Die Tab. 6 weist Resultate auf, die wir beim Studium des Abbaues von Histamin und Cadaverin durch Frauensera in verschiedenen Stadien von normaler Gravidität erhalten haben (54 Fälle mit Werten für den Abbau des Histamins und den Quotienten C/H).

In Übereinstimmung mit früheren Resultaten [KAPELLER-ADLER, 1951 (1)] wurde der stärkste enzymatische Abbau des Histamins in der

Tabelle 6. *Normale Schwangerensera. Untersuchung der Histaminaseaktivität und des enzymatischen Abbaues des Cadaverins im Verhältnis zu dem vom Histamin. 1 ml Serum.*

Zahl d. Sera	Grav. Woche	Histaminase/P.U.	C/H	Zahl d. Sera	Grav. Woche	Histaminase/P.U.	C/H
1	16	4,50	1,55	28	27	17,00	1,24
2	16	5,50	1,54	29	28	19,50	1,59
3	16	7,00	1,79	30	28	18,00	1,20
4	16	6,50	1,92	31	28	16,70	1,57
5	17	4,50	2,00	32	28	14,50	1,34
6	17	7,50	1,80	33	29	18,50	1,89
7	18	8,50	1,61	34	30	14,50	1,69
8	18	9,50	1,31	35	30	14,00	1,88
9	18	6,00	1,41	36	30	14,20	2,01
10	19	11,00	1,82	37	31	14,00	1,64
11	20	12,00	1,67	38	32	12,50	1,70
12	20	10,00	1,47	39	32	10,50	1,81
13	20	9,80	1,89	40	33	13,80	1,48
14	20	10,00	2,05	41	33	15,30	1,86
15	21	9,00	1,28	42	33	14,00	1,57
16	21	11,50	2,00	43	33	16,20	1,82
17	21	10,50	2,05	44	33	10,30	1,48
18	22	19,00	2,05	45	35	13,00	1,43
19	22	13,50	1,56	46	35	11,70	1,79
20	22	16,00	1,84	47	35	13,70	1,43
21	23	22,00	2,00	48	35	11,30	1,00
22	24	19,50	1,57	49	36	12,70	1,87
23	24	20,00	1,50	50	38	10,00	1,55
24	24	19,00	1,32	51	38	10,50	1,05
25	24	19,00	1,87	52	40	10,00	1,90
26	27	16,00	1,88	53	40	9,00	1,28
27	27	21,50	2,14	54	42	8,00	1,97

Zeit zwischen der 22. und 28. Schwangerschaftswoche beobachtet. Interessanterweise schwankte der enzymatische Abbau des Cadaverins von Fall zu Fall, was leicht aus den verschiedenen Werten für C/H aus der obigen Tabelle zu ersehen ist. Diese Werte waren unabhängig von dem Stadium der Gravidität und von der Größe des enzymatischen Histaminabbaues, da oft ein und derselbe Wert für C/H, sowohl bei einem sehr starken, als auch einem sehr schwachen Abbau von Histamin erhalten wurde. Es ist weiter bemerkenswert, daß die meisten Werte für C/H unter 2 lagen.

Tabelle 7. *Sera von Schwangerschaftstoxämien. 1 ml Serum.*

Zahl d. Sera	Grav. Woche	Histaminase/P.U.	C/H	Zahl d. Sera	Grav. Woche	Histaminase/P.U.	C/H
1	26	12,20	2,50	13	38	5,20	2,60
2	29	2,20	2,41	14	38	1,50	8,13
3	30	3,00	5,33	15	39	3,00	2,73
4	32	4,00	2,30	16	39	2,00	7,00
5	33	6,50	2,80	17	40	3,00	4,50
6	35	3,25	5,23	18	40	5,00	4,30
7	35	2,00	6,00	19	41	2,50	7,00
8	36	6,00	2,58	20	41	4,50	3,67
9	36	5,00	3,00	21	41	6,20	3,47
10	36	5,00	2,50	22	42	3,70	5,60
11	37	4,00	6,37	23	43	6,00	5,00
12	38	7,80	3,33				

Sehr verschiedene Resultate wurden jedoch in den entsprechenden Untersuchungen von Frauenseren mit Schwangerschaftstoxikosen erhalten (Tab. 7, 23 Fälle). Diese Schwangerensera wiesen, wie schon früher gefunden worden war [Kapeller-Adler, 1951 (1)], eine sehr geringe Fähigkeit, Histamin aufzubauen, auf. Aus den Werten für den Quotienten C/H geht jedoch sehr deutlich hervor, daß diese Sera Cadaverin sehr gut abzubauen vermögen. Der Quotient C/H war charakteristischerweise in den meisten untersuchten Fällen sehr hoch, in allen Fällen lag er weit über 2.

e) Einwirkung von Plazentar- und gereinigten Schweinenierenextrakten auf Substratgemische. 25 verschiedene Plazentarextrakte, sowie 3 verschiedene gereinigte Nierenpräparationen wirkten auf Substratgemische, welche neben Histamin noch ein anderes Diamin enthielten.

Aus Tab. 8 kann man leicht ersehen, daß der Abbau des Histamins weder durch die gleichzeitige Anwesenheit von Cadaverin noch durch diejenige von Putrescin oder Agmatin beeinflußt wurde. Demgegenüber wurde der Cadaverinabbau ziemlich stark durch Anwesenheit von Putrescin und noch viel stärker durch diejenige von Agmatin herabgesetzt, welches auch den Abbau des Putrescin ziemlich stark reduzierte.

Tabelle 8. *Einwirkung von Plazentar- und gereinigten Schweinenierenextrakten auf Histamin, Cadaverin, Putrescin und Agmatin und deren Gemische.*

Extrakte von	Substrate (je 1 mg Substrat Chlorhydrat bzw. Sulfat)									
	H	C	P	A	H+C	H+P	H+A	C+P	C+A	P+A
	Enzymatische Aktivität in P.U. (Permanganate units)									
Plazenten	15,4	30,6	7,3	3,8	15,2	15,1	14,9	18,4	11,3	5,7
Schweinenieren	20,0	5,4	2,5	0	19,5	19,1	19,4	4,4	1,0	1,7

Bei den Schweinenierenextrakten fällt es auf, daß das Agmatin, trotzdem es selbst nicht abgebaut wurde, den enzymatischen Abbau von Cadaverin und Putrescin stark beeinflußte.

In unveröffentlichten Untersuchungen wurde früher gefunden, daß das Substratsoptimum für den enzymatischen Abbau sowohl des Cadaverins als auch des Putrescins dasjenige des Histamins um ungefähr das 20fache übertreffe.

In der Tab. 9 sind Resultate zusammengefaßt, welche erhalten wurden, wenn Plazentar- und Schweinenierenextrakte auf Gemische von Histamin mit optimalen Mengen von Cadaverin oder Putrescin

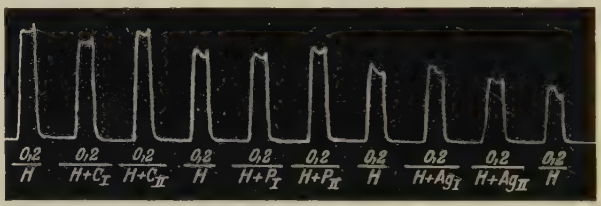


Abb. 1. Isoliertes Meerschweinchenileum. Einwirkung eines Plazentarextraktes auf Gemische von Histamin mit anderen Substraten.
H = 6 γ Histaminbase/6 ml; H+C_1 = 6 γ Histaminbase + 6 γ Cadaverinbase/6 ml; H+C_2 = 6 γ Histamin + 120 γ Cadaverin/6 ml; H+P_1 = 6 γ Histamin + 6 γ Putrescin/6 ml; H+P_2 = 6 γ Histamin + 120 γ Putrescin/6 ml; H+A_1 = 6 γ Histamin + 6 γ Agmatin/6 ml; H+A_2 = 6 γ Histamin + 120 γ Agmatin/6 ml.

einwirkten. Aus den erhaltenen Ergebnissen geht deutlich hervor, daß auch die Beimengung der 20fachen Menge von entweder Cadaverin oder Putrescin den Abbau des Histamins nicht zu beeinflussen vermochte. Dieses Versuchsergebnis wurde auch mittels des biologischen Histamintestes bestätigt.

Die Abbildung zeigt ebenfalls, daß weder die Beimengung von Cadaverin noch von Putrescin in der einfachen oder 20fachen Menge zu einem Plazentarextrakt den Histaminabbau beeinflußt hat. Denn die nach Beimengung von Cadaverin oder Putrescin übriggebliebene Histaminmenge blieb dieselbe und stieg keineswegs an, wie es im Falle einer Beeinflussung zu erwarten gewesen wäre.

Tabelle 9. *Einwirkung von Plazentar- und gereinigten Schweinenierenextrakten auf verschiedene Konzentrationen von Cadaverin und Putrescin und deren Gemische mit je 1 mg Histaminchlorhydrat.*

Extrakte von	Substrate								
	H	C_1	C_2	P_1	P_2	H+C_1	H+C_2	H+P_1	H+P_2
	Enzymatische Aktivität in P.U.								
Plazenten	13,4	23,3	23,5	6,1	6,4	13,3	13,0	13,0	13,1
Schweinenieren	9,4	3,0	3,3	1,9	2,3	9,8	9,5	11,0	10,8

C_1 = 1 mg Cadaverinchlorhydrat; C_2 = 20 mg Cadaverinchlorhydrat; P_1 = 1 mg Putrescinchlorhydrat; P_2 = 20 mg Putrescinchlorhydrat.

Diskussion.

In der vorliegenden Arbeit ist der Versuch unternommen worden, den Wirkungsmechanismus der Histaminase von demjenigen der Diaminoxydase abzutrennen und in Anlehnung an frühere Ergebnisse zu demonstrieren, daß die Histaminase das spezifische Enzym für Histamin sei. Die erhobenen Befunde zeigen deutlich, daß der enzymatische Abbau des Histamins in Plazentarextrakten, Gravidensera und Schweinenierenpräparationen unabhängig von dem der Diamine, Cadaverin, Putrescin und Agmatin verläuft. Denn nur so sind die stark divergierenden Werte, die wir für die Quotienten C/H, P/H und A/H je nach dem Ursprunge und dem Reinigungsgrad des Untersuchungsmaterials erhalten haben, zu erklären. Wenn die Histaminase identisch mit der Di-, aminoxydase wäre, dann müßten diese Quotienten, welche das Verhältnis des enzymatischen Abbaues des Cadaverins, Putrescins und Agmatins zu demjenigen des Histamins darstellen, unter allen Umständen konstante Werte ergeben.

Den mit Schweinenierenextrakten erhaltenen Ergebnissen widersprechen hunderte von Bestimmungen (die hier nur zum Teil berücksichtigt werden konnten), nach denen Plazentarextrakte und Gravidensera Cadaverin viel stärker als Histamin abbauen. Der Quotient C/H in diesen biologischen Medien ist viel größer als 1, meist 1,5, dagegen in gereinigten Schweinenierenextrakten ist er 0,25. Leider gelang es nicht, Plazentarextrakte weiter zu reinigen, da jeder derartige Versuch mit einem sofortigen Verlust der gesamten enzymatischen Aktivität verbunden war.

Die in den Tab. 4, 5, 6 und 7 dargestellten Resultate dürften außerdem für das Studium der Schwangerschaftstoxikosen von Interesse sein. Nach normalen Schwangerschaften beläuft sich in Plazenten der Quotient C/H auf 1,5—1,6, nach milden Schwangerschaftstoxämien auf 1,96, in Fällen von schweren Toxämien (bei sehr reduzierter Histaminasewirksamkeit) auf 2,34. Auch nach Zwillingsgraviditäten war ein analoger Unterschied feststellbar. In den Gravidenseren schwankte der Quotient C/H willkürlich in den verschiedenen Stadien der normalen Gravidität, lag jedoch in den meisten Fällen unter 2. In Schwangerschaftstoxämien findet man bei einer starken Herabsetzung der Serumhistaminaseaktivität den Quotienten C/H in den meisten Fällen enorm angestiegen. All diese Resultate deuten darauf hin, daß in Toxämien Cadaverin im Gegensatz zu Histamin normal abgebaut wird.

Diese Beobachtung deutet auf die spezifische Bedeutung der Histaminase für den Verlauf der normalen und toxämischen Schwangerschaft erneut hin. Ein stark erhöhter C/H-Quotient bei reduzierter Histaminaseaktivität im Gravidenserum könnte sogar für die diagnostische Beurteilung von Graviditätstoxämien herangezogen werden, da ein solcher Serumbefund häufig erhoben werden kann, lange bevor klinische Symptome manifest werden.

Die in Tab. 8 und 9 und in der Abb. 1 festgehaltenen Resultate bilden eine weitere Stütze für die Annahme, daß der Mechanismus des Histaminabbaues spezifisch von dem des Cadaverins, Putrescins und Agmatins abzutrennen ist.

Die Beobachtung, daß nicht einmal die 20fache Menge von Putrescin irgendeinen Effekt auf den Histaminabbau hat, steht im Widerspruch zur Behauptung von Werle (1941), welcher Autor Lösungen von Putrescin zur vollständigen Inaktivierung der Histaminase empfiehlt.

Aus den Untersuchungen ergeben sich sogar Zweifel an der Einheitlichkeit der Diaminoxydase. Sollte diese ein einheitliches Enzym darstellen, wäre es nicht leicht zu verstehen, warum Plazentarextrakte Cadaverin viel stärker angreifen, als Schweinenierenextrakte und warum die letzteren Agmatin weniger oder gar nicht abbauen. Man würde für ein einheitliches Enzym ein konstantes Verhalten gegenüber den genannten Substraten, unabhängig von dem Ursprung des Enzyms, erwarten. Wir neigen daher eher der Ansicht zu, daß es keine einheitliche Diaminoxydase gibt, sondern, daß spezifische Enzyme für den Abbau dieser einzelnen Substrate existieren.

In diesem Zusammenhange sei an eine Arbeit von Blaschko (1949) wieder erinnert. Dieser Autor fand, daß die Diaminoxydase Diamine nur bis zu einer Kettenlänge von 8 Kohlenstoffatomen zerstöre; Diamine mit mehr als 7 oder 8 C-Atomen werden hingegen durch Monaminooxydase abgebaut, welche andererseits gegenüber Diaminen mit 6 oder weniger C-Atomen unwirksam bleibt.

Zusammenfassung.

Schweinenierenextrakte im rohen oder gereinigten Zustande, sowie Plazentarextrakte und Gravidensera wurden auf ihre Fähigkeit zum Abbau von Histamin, Cadaverin, Putrescin und Agmatin in Parallelversuchen untersucht. Der enzymatische Effekt an den letztgenannten 3 Diaminen wurde zu demjenigen an Histamin in Beziehung gebracht, so daß die Quotienten C/H, P/H und A/H das jeweilige Verhältnis des abgebauten Cadaverins, Putrescins oder Agmatins zum abgebauten Histamin angeben. Diese Werte ergaben keineswegs eine konstante Größe, wie zu erwarten gewesen wäre, wenn Zellers Behauptung, daß die Histaminase identisch sei mit der Diaminoxydase, Gültigkeit hätte. Die Werte schwankten vielmehr beträchtlich, nicht nur von Schweinenierenextrakten zu Plazentarextrakten oder zu Gravidenseren, sondern sogar von einem Nierenextrakt zum anderen, einer Plazenta zur anderen und einem Gravidenserum zum anderen. In Versuchen mit Substratgemengen wurde weiter gefunden, daß weder Cadaverin noch Putrescin

noch Agmatin irgendeinen Einfluß auf den Histaminabbau haben. Demgegenüber beeinflußten diese Substrate, wenn sie in Gemengen vorlagen, gegenseitig ihren eigenen enzymatischen Abbau. Auf Grund der Ergebnisse dieser und früherer Arbeiten ist die Histaminase als ein nur für Histamin spezifisches Enzym anzusehen und von dem Begriff der Diaminoxydase abzutrennen.

Plazenten und Sera von Frauen mit Graviditätstoxämien unterscheiden sich deutlich in ihrer Fähigkeit zum Abbau von Histamin und Cadaverin von solchen, welche von normalen Graviden stammen. Die Bedeutung dieser Beobachtung für die Beurteilung von Schwangerschaftstoxikosen wird erörtert.

Literatur.

Anrep, G. V., G. S. Barsoum and A. Ibrahim: (1) J. of. Physiol. **106**, 379 (1947); (2) J. Obstetr. **54**, 619 (1947). — Best, C. H.: J. of Physiol. **67**, 256 (1929). — Blaschko, H.: 1st Intern. Congr. Biochem. Abstr. **565** (1949). — Kapeller-Adler, R.: Biochemic. J. **38**, 270 (1944); **44**, 70 (1949); (1) Biochemic. J. **48**, 99 (1951); (2) Biochemic. J. **48**, XXI (1951); (1) Biochemic. J. **51**, XXI (1952); (2) IIe Congrès International de Biochimie, Paris 21.—27. Juillet 1952, Résumés des Communications, 132; (3) Biochemic. J. **51**, 610 (1952). — Tabor, H.: J. of Biol. Chem. **188**, 125 (1951). — Werle, E.: Biochem. Z. **311**, 270 (1941). — Zeller, E. A.: (1) Helvet. chim. Acta **21**, 880 (1938); (2) Helvet. chim. Acta **21**, 1645 (1938). — Zeller, E. A., Birkhäuser, H., M. Mislin u. M. Wenk: Helvet. chim. Acta **22**, 1381 (1939). — Zeller, E. A., R. Stern u. M. Wenk: Helvet. chim. Acta **23**, 3 (1940).

Dr. R. Kapeller-Adler, Institut für klinische Chemie der Universität Edinburgh, Royal Infirmary Edinburgh, Schottland.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 502—511 (1953).

Madison Foundation for Biochemical Research New York.

Elektrische Erscheinungen in endokrinen Organen*.

Von

Rudolph Keller.

(Eingegangen am 23. Februar 1953.)

Diese Untersuchung der elektrischen Komponente des innersekretorischen Stoffwechsels ist aufgebaut auf zwei Methoden, erstens auf der Beobachtung von Testobjekten von bekannter mikroskopischer Elektrotopographie und zweitens auf einer breiten Kontrolle durch die alte eindimensionale Papierchromatographie von Schönbein und Goppelsroeder.

In den letzten 25 Jahren hat die mikroelektrische Untersuchung der Organe Fortschritte gemacht. Es wurden in der Mehrzahl der Organe elektrostatische Potentialdifferenzen gefunden zwischen negativem Blutplasma und positiven Gewebezellen sowie überwiegend positiven roten Zellen. Die Schilddrüse, die Galle und wahrscheinlich auch die Hypophyse scheinen Ausnahmen zu sein, da sie überwiegend negativ gegenüber dem Blut geladen und durch extracelluläre Mineralien und Akkumulation von sauren Farbstoffen charakterisiert sind. Ferner hat sich in Deutschland unter den Morphologen eine Richtung entwickelt, welche die herrschende Auffassung, daß die meisten Zellsalze im lebenden Körper nahezu vollkommen in Ionen dissoziiert sind, für die gefärbten Salze, die Farbstoffe, eingeschränkt hat.

Die Pflanzenphysiologen S. Strugger, H. Drawert, J. Gicklhorn, die Pathologen H. Siegmund, N. Schümmelfeder, der Histologe K. Zeiger und andere haben — zumeist in quantitativen Experimenten — übereinstimmend gezeigt, daß unter gewissen p_H-Bedingungen die Farbstoffe als ganze Moleküle erscheinen (Strugger 1948, Drawert 1940). Die Objekte der experimentellen Pathologen, z. B. die von O. Loewi und H. H. Dale entdeckten Herzhormone bestehen wohl während ihrer Wirkung zeitweise nicht aus Ionen, verhalten sich vielmehr wie die meisten Inkrete: Toxine und Anti-Toxine, die hochmolekulare Vollmoleküle und Kolloide darstellen. Die Mehrzahl der Hormone wie überhaupt die Mehrzahl der in diesem Laboratorium untersuchten biologischen Moleküle und Kolloide gefärbter und ungefärbter Natur sind Träger von negativen Oberflächenladungen; eine Minderzahl von Hormonen u. a. wahrscheinlich mehrere Schilddrüsenhormone verhalten sich im elektrischen Feld des Körpers wie extracelluläre Substanzen, die nach unseren Erfahrungen in lebenden Zellen positiv geladen sind (Keller 1947, Keller 1932).

---

* Diese Arbeit ist Herrn Professor Dr. Otto Loewi zu seinem 80. Geburtstag gewidmet, Vorbild und Lehrer einer Generation von Physiologen und Pathologen.

Die Kolloidchemiker hatten bereits zu Beginn des Jahrhunderts entdeckt, daß Hühner-Eiweiß in seiner Ladung von dem p_H der Lösung abhängig ist und oberhalb p_H 4,9 zur Anode wandert, unterhalb p_H 4,8 aber gewöhnlich zur Kathode. Die Wanderungsrichtung hängt auch von der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels ab; in niedrig dielektrischen Medien wandern fast alle in diesem Laboratorium untersuchten Substanzen, z. B. Jod in Methylalkohol, Äthylalkohol, Petroleum, zur Kathode. Die praktische Bedeutung dieser Tatsache für Experimentatoren liegt u. a. darin, daß in der Papierchromatographie von Consden, Gordon und Martin (Consden 2) als zweites Lösungsmittel gewöhnlich solche von niederer Dielektrizitätskonstante benützt werden, die zu einer teilweisen Umkehrung der Wanderungsrichtung oder zu einer Verbreiterung und größeren Differenzierung der Streifen oder Flecke führen mögen. Es ist auch wahrscheinlich, daß Lipoidschichten der Membranen eine niedrigere Dielektrizitätskonstante haben.

Man sieht aus diesen wenigen Beispielen, daß die vor 120 Jahren von Michael Faraday entdeckte Dielektrizitätskonstante eine wichtige Naturkonstante ist, der die Physiologie oder Pathologie bei ihren Experimenten Rechnung tragen sollte.

Methoden.

Für diese Arbeit kamen zwei Hauptmethoden in Betracht: erstens die eindimensionale Papierchromatographie von Goppelsroeder und seinen Schülern Fichter und Sahlbom und zweitens die in diesem Laboratorium ausgearbeitete Methode der Testobjekte, das ist das Studium von lebenden Objekten bekannter Elektrotopographie: Mäuse, Hühnerembryos, Querschnitte von Pflanzen, vornehmlich aber lebende Daphnien. Diese wurden entweder mit Farbstoffen oder mit farblosen Reagenzien, Eisenchlorid, Silbernitrat, Ammoniak, mit Indicatoren wie Phenolrot, Neutralrot, Thymolblau, alkalischen und sauren Puffern behandelt, die später mit Reagenzien oder durch Lichtwirkung in den Zellen oder in Filtrierpapier nachgewiesen werden können.

Die Papierchromatographie stimmt nicht genau mit der Methode der „diphasischen Farbstoffe" überein. Nach unserer Hypothese verteilen sich die Farbstoffe des Typus Thioflavin S in der lebenden Zelle bekannter Elektrostruktur gelbgrün an negativen Stellen, blau an den positiven, während im Filterpapier sowohl das Blau der positiven Komponente um R_f 0,2, aber nur selten eine dünne, gelbliche Linie an der Front beobachtet wird. Für diese Unstimmigkeit haben wir keine Erklärung.

Die Technik der elektroanalytischen Vitalfärbung ist noch so unsicher, daß man des Resultats nur dann gewiß ist, wenn es durch Nachprüfungen mit von einander unabhängigen Methoden bestätigt worden ist.

Wenn wir sagen, daß Fichters Arbeit bei unserer Filtrierpapier-Kontrollmethode benutzt wurde, so meinen wir viel weniger die oft zitierte Regel von Fichter-Sahlbom, daß der Raum um R_f 0,80—1,00 im Filtrierpapier der Kathodenraum ist und der Raum um R_f 0,01—0,20 der Anodenraum (wie in der alten Ausdrucksweise noch heute von den meisten Handbüchern, mit Ausnahme der von Abderhalden und Peterfi, zitiert). Diese falsche Regel des sonst sehr genauen

Beobachters Fichter stimmte mit der allgemeinen Terminologie von 1915 überein und beruht auf der korrekten Beobachtung, daß verdünntes Methylenblau in Filtrierpapier das Wasser vorauswandern läßt. Erst 1916 veröffentlichte A. Bethe seine Entdeckung, daß Methylenblau im Gegenteil ein Farbstoff ist, der großenteils zur Anode wandert, welche Feststellung von allen späteren Beobachtern bestätigt und erweitert wurde. Fichter selbst hatte in seiner ersten Schrift 1910 berichtet, daß Eisenhydroxyd in Alkali, also negativiertes Eisenhydroxyd (das zur Anode wandert) das Wasser im Filtrierpapier vorauseilen läßt, womit er zuerst die richtige Regel gegeben hat. Von der großen Mehrzahl der Handbücher wurde aber die spätere, unrichtige Regel übernommen, die das Gegenteil des Sachverhalts postuliert. Dieser Irrtum ist hier deshalb so breit dargestellt, weil es nach dem Tode Fichters wichtig ist, daß der richtige Sachverhalt bekannt wird.

Unsere Methode deckt sich im wesentlichen mit denen der neueren deutschen Vitalfärber Strugger, Schümmelfeder, Drawert (1948—1950); wie diese bevorzugen wir Vitalfärbung in Fluorescenzlicht, mit dem man bei millionenfacher Verdünnung noch gute Differenzierungen erhält. Fichter hat in seiner späteren Arbeit postuliert, daß die elektrische Verteilung im Filtrierpapier in der Weise geschieht, daß an der Basis des Aufsteigens — nach Consden-Martin bei R_f 0,10—0,40 — sich die Kathode befindet und bei R_f 0,70—1,00 die Anode. Consden-Martin lehnen eine partiell elektrische Erklärung ihrer bahnbrechenden Entdeckungen ab, aber Fichter und viele andere glaubten an ein elektrisches Feld im Filtrierpapier während der Ausbreitung einer Lösung, mit der Einschränkung, daß Fichter in Übereinstimmung mit der Ansicht seiner Epoche den Typus Metylenblau für völlig dissoziiert ansehen mußte und demzufolge die Anode an der Front annahm (bei R_f 1,00 heutiger Nomenklatur).

Experimente.

Ein Filtrierpapier-Quadrat Whatman No. 4 (von 10 cm Seitenlänge) wurde in $CuSO_4$-Lösung getaucht und trocknen lassen, danach ein Tropfen schwach-alkalischer Neutralrot-Lösung (1%) in Wasser auf das Papier getropft. Jenseits des ausgebreiteten Tropfens saugt das Papier zwischen R_f 0,10 und 0,30 das schwach-orange, alkalisierte Neutralrot an und bildet einen roten Ring, der in federartige Strahlen übergeht, welche für Anoden charakteristisch sind, in einigen Fällen aber auch in negativen Räumen beobachtet wurden. Im Frontraum R_f 0,60—1,00 kann man mit Schwefelammoniumdampf braun bis braunschwarzes Kupfersulfid erzeugen. Der äußerste Frontring bei R_f 0,95—1,00 wird eine schwarze Linie. Man sieht hier beide Elektroden in einem Bild, die Kathode an der Front, die Anode an der Basis. Die Kontraste werden schärfer, wenn man die Filtrierpapiere mit Reagenzien für Alkali, z. B. Phenolphtalein, Phenolrot oder Curcuma über ein Gefäß mit starkem Ammoniak hält oder die Filtrierpapiere mit Reagenzien für Säure über Eisessig oder konzentrierte Salzsäure. Durch diese Verstärkung des Gegensatzes wird zwar die Beweiskraft der Experimente ein wenig vermindert, aber es kann kaum bezweifelt werden, daß sich der Anodenraum an der Basis und der Kathodenraum näher zur Front befindet. Dieser Versuch läßt sich mit anderen Schwermetallen und Indicatoren variieren — immer mit dem gleichen Resultat.

Eine Anzahl von alkalischen, neutralen und sauren Substanzen werden auf Filterpapier Whatman Nr. 4 getropft, das vorher in Indicatoren wie Neutralrot, Phenolrot, Phenolphtalein getaucht und dann getrocknet worden ist. Es wurde Neutralrot von 0,03% oder in einer durch allmähliches Zugeben von molarem NaOH orangegefärbten Lösung benutzt. Dann wurden 2 Tropfen Eisenchlorid von 0,05% auf das alkalisierte Neutralrot-Filtrierpapier getropft, worauf sofort am Rande des Tropfens in R_f 0,02—0,10 eine typische Anode erschien. Diese Umwandlung von alkalischem in saures Neutralrot in diesem R_f ist wahrscheinlich als eine Ionenreaktion zu deuten.

Sehr schöne Bilder in Schwermetallsalzen mit typischen faserigen Anoden in dem gleichen Anodenfeld gibt auch Essigsäure, 1/10 normal, mit einem rötlichen Ring um 0,03 und einem farblosen Ring an der Kathode bei R_f 0,994.

Die für die Physiologie des endokrinen Systems wichtigen Salze Bromnatrium und Jodkalium ließen sich unter den Bedingungen unserer Experimente nicht auf dem Filtrierpapier elektrolytisch zerlegen, zumindest nicht auf direktem Wege. Nach Verstärkung durch Dämpfe von Ammoniak, Salzsäure, Essigsäure, ließen sich schwache Unterschiede der Säure- oder Alkaligehalte erkennen. Was im Filterpapier unter den Potentialen des Coehnschen Gesetzes (1897) vor sich geht, daß nämlich niedrig dielektrische Körper sich negativ aufladen, reicht bei den Halogeniden nicht immer aus, um nachweisbare Ströme zu erzeugen, sondern vielleicht nur zu elektrophoretischen Wanderungen ganzer Moleküle, die viel weniger Energie verbrauchen.

In der Literatur findet man vereinzelt Angaben, daß Jod in freiem Zustande an der Kathode gefunden wurde. In unseren Laboratorien in Europa und später in New York haben wir seit Jahren Versuche gemacht teils in hohen Spannungen, teils in lebenden Testobjekten, teils in Papierchromatogrammen. Wir fanden freies Jod in niedrigen Dieletrica — Butanol, Methanol, Alkohol, Petroleum, Äther — mit allen diesen Methoden unweigerlich an der Kathode, Jodide und die meisten biologischen Jodkomplexe ebenfalls an der Kathode, desgleichen Chloride, Bromide, Rhodanide. Freies Jod in Wasser und hohen Dielektrika wurde an der Anode gefunden.

Die von uns untersuchten Schilddrüsen stammten von etwa 120 Mäusen, 24 Hühnerembryonen, 2 Kaninchen und von 2 operierten Patienten. Die letzteren waren eine halbe bis dreiviertel Stunde nach der Operation naturgemäß nicht mehr für Lebendfärbungen auszuwerten.

Neben der Methode der lebenden Testobjekte, die auch von den eingangs erwähnten Pflanzen- und Tierhistologen ausgeübt wird, wenn auch nur mit intakten lebenden Objekten, während wir auch Querschnitte supravital zur Kontrolle heranziehen, benutzen wir noch eine Reihe anderer Methoden. Wir haben z. B. blaue Fluorescenz-Farbstoffe — Aesculin oder MDD 2062 der Firma DuPont — nach einem gelbgrünen Farbstoff z. B. Uranin injiziert, immer mit derselben Ladung und Konzentration, oder analoge negative Fluorescenz-Farbstoffe von kontrastierender Farbe, um die Hauptlinien der Bewegung der extracellulären und intracellulären Substanzen in lebenden transparenten Geweben zu studieren. Bei höheren Tieren stößt diese Methode wegen der Undurchsichtigkeit der meisten Gewebe auf große praktische Schwierigkeiten; sie verlangt Opak-Illumination für kurzwelliges Licht,

vorzugsweise der Wellenlängen um 4000, die theoretisch in das Gebiet des weißen Lichts gehören, aber noch eine leicht photographierbare Fluorescenz hervorbringen.

Vor einigen Monaten veröffentlichten wir (Keller 1952) eine bisher nur qualitative Methode, in einzelnen günstigen Fällen den elektrophoretischen Bewegungen der Kochsalzmoleküle mit dem Fluorescenzfarbstoff Uranin nachzugehen, der ein Natriumfluoresceinat ist, das wohl gewöhnliches Na^{23} als Base enthält, aber praktisch mit gewissen Einschränkungen in lebenden Zellen die Natriumbewegungen erkennen läßt, da es noch in 1:500000 und sogar größerer Verdünnung wie ein Radio-Autograph die Molekülströme der extracellulären Gruppe direkt im Leben beobachten läßt.

Ferner haben wir eine Methode der diphasischen Fluorescenz versucht mit Farbstoffen, die sich gemäß unserer Arbeitshypothese an elektro-positiven und elektro-negativen Strukturen ansammeln. Diese Methode ist noch unvollkommen und die Resultate müssen durch einphasige Farbstoffe und andere Verfahren kontrolliert oder mit Mikroelektroden und Elektrometer gesichert werden.

Um die umstrittene Frage zu studieren, ob die für die innere Sekretion wichtigen Jodide-Bromide-Rhodanide in wäßrigen Lösungen als mehr molekül-ähnliche oder mehr ionen-ähnliche Partikel zur Kathode wandern, haben wir zahlreiche Versuche unternommen, hauptsächlich mit der alten, eindimensionalen Papierchromatographie, um das Verhalten der Halogenide im elektrischen Feld zu beobachten. So fruchtbar sich die zweidimensionale Chromatographie in feinen quantitativen Bestimmungen erwiesen hat und so gewiß sie in der Biochemie der Zukunft eine führende Rolle spielen wird, so hat doch für einfache qualitative Experimente die eindimensionale Bestimmung des Wanderungssinnes im Filtrierpapier wegen ihrer Schnelligkeit ihre Vorzüge. Von den Autoren der zweidimensionalen Papierchromatographie, Consden, Martin und Synge (Consden 1944) wurde die quantitative Terminologie des Faktors R_f übernommen, die auch für eindimensionale Bestimmungen unentbehrlich geworden ist.

Die untersuchten Alkali- und Erdalkali-Halogenide einschließlich der Rhodanide, KI, NaI, NaBr, KCNS, gingen alle zur Front des Filtrierpapiers Whatman Nr. 4. Wir haben zahlreiche Versuche mit freiem Jod und mit Alkali- und Erdalkali-Bromiden und mit Rhodaniden unternommen. Das freie Jod erschien immer an der Anode, die Jodide, Bromide und Rhodanide an der Kathode. In R_f-Terminologie erschien 40mal verdünnte Lugolsche Jod-Jodkalium-Lösung auf dem Filtrierpapierstreifen geteilt. Das freie Jod erschien bei R_f 0,05—0,20 (Anode), das Jodid bei R_f 0,95—1,00 beide nach Behandlung mit Stärke blauschwarz. Bei freiem Jod war das Stärke-Reagens nicht unbedingt notwendig, da die Cellulose der Whatman-Filtrierpapiere allein mit freiem Jod unter unseren Versuchsbedingungen in Lösungen von Prozenten manchmal eine dunkelblaue, fast schwarze Verbindung gibt.

Es ist seit einem halben Jahrhundert bekannt, daß amphotere Stoffe durch Säurezusatz positiver werden, durch Alkalizusatz negativer. Diese Regel ließ sich sowohl in lebenden Testobjekten bekannter Elektrostruktur (beispielsweise Querschnitt von Efeu, Flieder) als auch im Filtrierpapier bestätigen.

Während sich im Falle der Halogenide eine lückenlose Übereinstimmung ergab, war dies zwischen positiven Natriumsalz-Molekülen und komplexen Kaliumsalz-Molekülen nicht der Fall. Wohl hat es sich bei der Schilddrüse gezeigt, daß diese im Gegensatz zu den meisten übrigen Organen viel Na und weniger K besitzt (Keller 1947), was mit der Hypothese der elktrischen Felder im Organismus übereinstimmt. Aber alle Bemühungen, den elektrischen Kontrast des Kaliums gegen das Natrium papierchromatographisch zu demonstrieren, schlugen fehl. In

Tierorganismen findet man in 99,5% der Fälle das Kalium in entgegengesetzter Bewegung zum Natrium (in Leber, Niere, Haut, Gehirn, Magen); jedoch läßt sich dies in Experimenten mit Filtrierpapier bisher nicht demonstrieren.

Für jene Experimentatoren, welche annehmen, daß in der Papierchromatographie der elektrostatische Gegensatz zwischen den einfach carboxylierten und den zweifach carboxylierten Aminosäuren auch eine wichtige Rolle spielt, erschien es als eine Bestätigung ihrer Hypothese, als die Laboratorien von F. N. Chaikoff (1951). von Leblond (1951) und Gross (1952) und andere ihre Resultate veröffentlichten, welche eine weitere Variabilität der elektrischen Ladungen der jodsubstituierten Aminosäuren erkennen ließen. In diesem Laboratorium, das spezialisiert ist für Vitalfärbungen im fluorescenten Licht und für elektroanalytische Mikro-Untersuchungen, lassen sich solche Versuche nur sehr schwer in einer einwandfreien Form durchführen. Gleichwohl läßt es sich auch mit den einfachsten Hilfsmitteln demonstrieren, daß die Ergebnisse der zitierten Autoren zutreffend sind.

Bei Wanderung von Lösungen unreinen, andere Aminosäuren enthaltenden Diiodotyrosins in physiologischer Salzlösung in Whatman-Filtrierpapier zeigte sich, daß eine intracelluläre Komponente vorhanden ist, welche zwischen R_f 0,10 und 0,35 mit erhitztem Ninhydrin in Butanol einen ziemlich breiten Streifen heraushebt, was zuerst von Tong, Taurog und Chaikoff (1951) gezeigt und seitdem bestätigt wurde.

Diese Versuche wurden variiert mit konzentrierten und schwachen Säuren wie Eisessig und verdünnter Essigsäure; sie ließen keine Veränderung der Position der Streifen auf dem Papier erkennen. Dann wurde den Lösungen in NaCl 20% Harnstoff zugesetzt, der die Dielektrizitätskonstante stark erhöht; die erwartete Verschiebung der Streifen nach der Basis wurde jedoch nicht beobachtet.

Ferner wurde der Butanolgehalt der Lösungen erhöht zu dem Zwecke, die D.E.K. herabzudrücken, was in vielen Fällen die Streifen nach der Front verschiebt. Das Bild des Chromatogramms verschob sich aber nicht in merklicher Weise, wie schon in den kalifornischen Versuchen gezeigt worden ist.

Schließlich haben wir die innersekretorischen Organe von Mäusen und Hühnerembryonen vor dem Ausschlüpfen mit Tageslichtfarben untersucht. Die Schilddrüse, und in besonderem Maße das Kolloid der Drüse, färbte sich schwarz mit Silbernitrat 0,05% nach Belichtung oder in Ammoniumsulfiddampf; mit basischen stark verdünnten Farben wurde das Epithel der Schilddrüse gefärbt, das Kolloid mit sauren Farbstoffen. Das ist keineswegs neu, entspricht aber der Annahme, daß das Kolloid negativ ist.

Wir haben uns begnügen müssen, die Schilddrüse vorläufig nur vitalfärberisch und chemisch auf ihre Mineralien zu untersuchen. Die elektrischen Ladungen und Ströme wurden von W. B. Cannon u. Mitarb.[116] beschrieben. Ferner haben wir bei ein paar ganz jungen Mäusen anscheinend funktionierende Thymusdrüsen gefunden, von denen eine inmitten der Schilddrüse photographiert wurde. Im farbigen Original ist sie deutlich schwächer gefärbt. Das Kolloid ist stärker gefärbt als das Epithel. Mit Vasoflavin, einem gereinigten Thioflavin S, erhielten

wir ähnliche Bilder. Gelegentlich wurden solche Bilder auch mit hochkonzentriertem Rhodamin (2%) erzielt, das sich in Daphnien, Mäusen, Hühnerembryonen und anderen Testobjekten wie ein positiver saurer Farbstoff verhält. Die gegensätzliche Färbung mit hochkonzentriertem und stark verdünntem basischen Methylenblau ist schon von Paul Ehrlich vor 70 Jahren beobachtet worden. Seine Erklärung dieses Paradoxons hat allgemein Annahme gefunden.

Diskussion.

Für die Zwecke der Betrachtung des inkretorischen Stoffwechsels genügt es, daß in Papierchromatographie sich die Lösungen beim Aufsteigen in der ersten Hälfte der Zone ein Feld aufweisen, das eine Spur angesäuert ist, und in der zweiten Hälfte ein neutrales Feld, falls man nur 1 Std aufsteigen läßt, wie es die meisten Lebendfärber und auch wir in der Mehrzahl der Fälle getan haben. Es sind aber viel weitergehende Resultate bekannt und von uns nachgeprüft worden.

In den einleitenden 4 Seiten seiner „Kapillar-Analyse" beschreibt Goppelsroeder (1910) nach Schönbein, daß der Lackmusfarbstoff in sehr schwach angesäuertem Extrakt hinter dem Wasser wandert, unten eine kleine rote Zone erzeugt und oben — an unserer hypothetischen Kathode — eine größere blaue alkalische Zone (S. 4). Goppelsroeder beschreibt selbst Versuche, in denen Schwefelsäure, Salzsäure und Ätzkali bis zur Front mit dem Wasser aufstiegen (S. 58). Solche Fälle haben wir auch beobachtet, aber nur selten. In der großen Mehrzahl der Experimente konnten wir nur den Verlust der Acidität an der Front-Kathode feststellen, aber nicht direkte Alkalität in der obersten Zone. Alle eigenen Experimente und alle Zitate, die mehr beweisen als daß im Filterpapier die oberste Zone frei von Säure ist oder nur Spuren von ihr nachweisen, haben wir als unerheblich für unsern Gegenstand unterdrückt.

Die Grundlage unserer Annahmen über den elektroosmotischen Teil der Stoffbewegungen im Körper bilden die Versuche von H. Kaunitz und B. Schober (Kaunitz, 1937). Kaunitz hat Kaninchen durch Mikroelektroden mit Elektrometern verbunden, die Potentiale des Leberparenchyms — normalerweise tagsüber positiv — und der Vena cava in normalem Zustand und nach Injektion von Ödemgiften wie Allylamin untersucht. Wenige Augenblicke nach der Injektion verminderten sich plötzlich die positiven Potentiale des Lebenparenchyms und die mehr negativen der Vena cava; 5 min später beobachteten wir unter dem Fluorescenz-Mikroskop das Uranin, wie es aus den leuchtenden Gefäßen in die bis dahin dunklen Leberzellen drang. Nach einer halben Stunde waren analysierbare Mengen von Kalisalzen aus den Leberzellen verschwunden und eine äquivalente Menge von Natriumsalzen eingedrungen. Die Reihenfolge dieser Vorgänge läßt uns vermuten, wo die Hauptursache der Ödeme und des Sturzes des Potentials gesucht werden muß. Auch Diphtherietoxin wurde den Kaninchen mit dem gleichen Erfolg injiziert.

In der letzten Zeit haben Laboratorien mit radioaktiven Tracern eine Reihe von Versuchen unternommen, die dazu geführt haben, daß wir heute Uranin und ähnliche Farbstoffe als ein (vorläufig nicht quantitatives, sondern nur qualitatives) Reagens für Natrium ansehen. Es ist längst bekannt, daß Uranin die Thyreoidea stark und elektiv färbt. Die Thyreoidea wurde von uns analytisch untersucht und, wie erwartet, ein Überschuß von Natrium gegen Kalium gefunden, der bei tierischen Geweben sehr selten ist.

In französischen Zeitschriften fanden wir Berichte über Experimente von J. Gruner u. Mitarb. (1951) mit radioaktivem Natriumbromid, die für unser Thema von Bedeutung sind. Die Autoren haben Versuche mit radioaktivem NaBr und anderen organischen Verbindungen beschrieben, welche große Konzentrationen von Brom in der Schilddrüse zeigten, nämlich 49 zu 1 gegen Blutplasma. Das war keine Überraschung für diejenigen, die gewohnt sind, mit der Bewegung der Stoffe in antagonistischen extra- und intracellulären Gruppen zu rechnen. Die gleichen Autoren haben ferner in der Hypophyse nicht weniger als 341 Einheiten (gegen 1 Blutplasma) gefunden, eine überraschend hohe Ziffer, viel höher als die für die Schilddrüse, die nach den bisherigen Analysen auf Grund der elektrischen Feld-Hypothese als das elektro-negativste Organ des Körpers galt. Es dürfte erst bei weiteren Untersuchungen klarwerden, ob auch die anderen Mitglieder der extracellulären Gruppe in dem gleichen Maße in dem Hinterlappen der Hypophyse vertreten sind. Wahrscheinlich ist das nicht. Wir betrachten es als unsere Aufgabe, die elektrische Charakteristik normaler und pathologischer Zellen zu erforschen, weil wir Methoden für die mikroskopische Untersuchung von Zellen und Zellteilen mittels Vitalfärbung zur Verfügung haben (Keller 1928, 1932, 1932, 1952). Selbstverständlich wäre es verfehlt, anzunehmen, daß alle Stoffbewegungen nur elektroosmotisch vor sich gehen. Ganz im Gegenteil glauben wir, daß die Ausstoßung der Inkrete durch Osmose und trotz einem schwächeren elektrischen Gegenpotentil erfolgt.

Es ist der Aufmerksamkeit vieler Endokrinologen entgangen, daß trotz des hohen und für die Physiologie der Schilddrüse fundamental wichtigen Gehalts an Jod, diese keineswegs eine bloße Akkumulation von Jodverbindungen darstellt. Der letztere Eindruck wurde dadurch hervorgerufen, daß Jod ein sehr hohes Atomgewicht hat. Wenn man in Molen rechnet, hat die Schilddrüse viel mehr von den leichteren Elementen Aluminium und Calcium (Underhill 1929). Die Schilddrüse hat einen Überschuß an elektropositiven Substanzen (Keller 1947) und ein Minus an negativen Substanzen, Glucose, Glykogen, negative Farbstoffe in großer Verdünnung. Es sind diese Tatsachen zusammen mit den Färbungen in diphasischen Farbstoffen oder in Kombinationen von Fluorescenz- und Tageslichtfarbstoffen, die zu der Annahme führen, daß elektrische Felder an der Arbeit der Schilddrüse beteiligt sind.

Das Problem der Schilddrüse liegt wahrscheinlich vornehmlich in der rätselhaften elektiven Anziehungskraft der Drüse entgegen einem osmotischen Gefälle für Jodsalze, sowohl für den positiven Teil der Hormone als auch für das positive Aluminium und Calcium. Wenn man die Versuchstiere während der Nachtstunden mit derselben Energie und Ausdauer mit radioaktiven Tracern untersuchen würde, wie man es bisher fast ausschließlich während der offiziellen Arbeitsstunden getan hat — so ist es nicht unmöglich, daß etwas Licht nicht nur in den Stoffwechsel der Schilddrüse kommt, sondern auch in den anderer inkretorischer Drüsen. Man sollte nicht vergessen, daß die Entlassung des Glykogens aus der Leber nach 1 Uhr nachts erfolgt (Claude Bernard).

Die Literaturübersicht von J. Gross und R. Pitt Rivers (London) enthält eine Reihe von Tatsachen, die für die Dominanz des elektrischen Faktors in der Schilddrüse sprechen, obwohl die Referenten ganz offenbar alle Bewegungen von Stoffen in der Schilddrüse chemisch zu erklären bereit waren, und durch eigene Untersuchungen bedeutende Beiträge zur Aufklärung des chemischen Stoffwechsels der Drüse beigesteuert haben.

Vor einigen Jahren haben wir in unseren Laboratorien den Fall der Honigdrüsen der Saubohne (Vicia faba) untersucht, die zu gewissen Zeiten starke Invertzuckerlösungen in den Honigdrüsen aufspeichert. Dr. Josef Pekarek (Diannelidis 1948) demonstrierte vitalfärberisch, daß die Färbungen nur durch verdünnte basische (negative) Farbstoffe geschehen und nur in den Perioden, in denen Zucker gleichzeitig von den Gefäßen zu den Nektarien transportiert wurde. Vor dem Honigsekret oder nach ihrer Beendung war eine Vitalfärbung der Nektarien mit basischen verdünnten Farbstofflösungen, die gleichsinnig geladen sind, unmöglich. Diannelidis hat die Nektarien mit dem Elektrometer und mit Mikroelektroden gemessen und gefunden (1948), daß die Potentiale die Hypothese über den elektroosmotischen Transport der Zuckermoleküle und ihrer ebenfalls negativen Begleitstoffe zu bestätigen scheinen. Diannelidis fand die von Pekarek und Keller erwarteten Potentiale zu den erwarteten Zeiten.

Schon vor Diannelidis hatte Beiglboeck (1944) Versuche am Krankenbett und mit Kaninchen beschrieben, die an sich nicht voll beweisend sein mögen, die aber die elektroosmotische Bewegung der Hexosemoleküle und des Inkrets Insulin im Körper zu stützen scheinen.

Die Nebennierenrinde halten wir für Produzenten von Sekreten, die außer anderen Aktionen auch die elektrischen Zellpotentiale des Körpers erhöhen. Nistler und Schober haben 1936 auf meine Anregung Kaninchen mit einem Perrucha-Elektrometer an Leber und Vena Cava mit Mikroelektroden gemessen. Nach Exstirpation der Nebenniere stürzte das Potential plötzlich herab und kehrte sich sogar um, indem die Leber negativ wurde gegen die Vena cava. Spritzte man dann Nebennierenhormon, so ging das Leberpotential wieder in die Höhe, aber nur auf dreiviertel bis höchstens siebenachtel der normalen Höhe. Später haben wir öfter unregelmäßige Ausfälle der Messungen beobachtet. Es ist wahrscheinlich, daß die Organe unter besonderen Umständen — Angst, Atemnot, oder auch des Nachts — verschiedene Potentiale aufweisen.

Wenn der Mineralgehalt der Organe den elektrischen Zellpotentialen proportional ist, wie wir Ursache haben anzunehmen, dann sind auch Insulin und die Geschlechtshormone schwache Erhöher der elektrischen Zellpotentiale. Insulin verursacht ein höheres mehr negatives Reduktionspotential des Blutplasmas. Mit dieser Tatsache stimmt es überein, daß Insulin auch die Mineralgehalte des Blutplasmas in dem gleichen Sinne beeinflußt wie corticale Nebennieren-Hormone, nur viel schwächer.

Zusammenfassung.

Verschiedene Stofftransporte im Körper werden als elektrophoretische Molekülbewegungen gedeutet. Bei dieser Annahme erscheinen die extracellulären Moleküle als elektropositiv, die intracellulären als negativ.

Adrenalin und Ödemgifte setzen die Zellpotentiale herab, Nebennierenhormone, Insulin, Geschlechtshormone erhöhen sie in dieser absteigenden Reihenfolge (Kaunitz).

Das Kolloid der Thyreoidea, der Hinterlappen der Hypophyse, die Gallencapillaren der Leber sind wahrscheinlich negative Zentren.

Neue Methoden der elektrischen Zelldifferenzierung mit einphasigen und zweiphasigen Farbstoffen, vorwiegend im Fluorescenzlicht, werden diskutiert, ferner eine qualitative Methode der Beobachtung von Natriumtransporten in lebenden Geweben mittels Uranin.

Der Gegensatz zwischen freiem negativen Jod und positivem Natriumiodid läßt sich papierchromatographisch leicht demonstrieren, nicht aber der Antagonismus zwischen Kalium und Natrium.

Wir sind Dr. Seymour S. Wanderman, New York, sehr verbunden für die Ausarbeitung der Methode für die selektive Färbung der Schilddrüse, Gallenblase und Harnblase und für seinen Rat und seine Hilfe bei dieser Arbeit; Frau Dr. Marianne Kreidl leistete wertvolle chemische Arbeit, Frau Mathilde de Montaigne technische Hilfe.

Literatur.

Beiglboeck, W.: Z. klin. Med. **143**, 592 (1944). — Bethe, A.: Kolloid-Z. **24**, 11 (1916). — Cannon, W. B., u. Mitarb.: Amer. J. Physiol. **41**, 74 (1916). — Consden, R., A. H. Gordon and A. J. P. Martin: Biochemic. J. **38**, 224 (1944). — Diannelidis, Th.: Phyton **1**, 7 (1948). — Drawert, H.: Flora **34**, 159 (1940) (bas. Farbst.); **35**, 21 (1942) (saure Farbst.). — Fichter, G.: Kolloidchem. Beih. **2**, 79 (1910). — Goppelsroeder, F.: Capillaranalyse, Dresden: Steinkopff 1910. — Gross, J., and R. Pitt-Rivers: Brit. Med. Bull. **8**, 137 (1952). — Gruner, J., S. S. Suna, M. Pubiano et J. Segarra: C. r. Soc. Biol. Paris **145**, 203 (1951). — Hasama, B.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **83**, 36 (1938). — Kaunitz, H. u. a.: Z. klin. Med. **31**, 219 (1937). — Keller, R., u. J. Gicklhorn: Abderhaldens Handbuch bioch. Arbeitsmethoden, V/**2**, 1248 (1928).— Keller, R.: Elektrizität in der Zelle. Mähr.-Ostrau: Kittl's Nachf. 1932, 3. Aufl. — Exper. Med. (New York) **5**, 163 (1947). — Pflügers Arch. **256**, 66 (1952). — Leblond, C. P.: Endocrinology **48**, 714 (1951). — Schümmelfeder, N.: Virchows Arch. **319**, 294 (1950). — Strugger, S.: Fluorescenz-Mikroskopie. Hannover: M. H. Schaper 1948. — Tannino, F.: Biochem. Z. **241**, 392 (1931). — Tong, W., A. Taurog and I. L. Tschaikoff: J. of Biol. Chem. **191**, 655 (1951). — Underhill, F. P. u. a.: Amer. J. Physiol. **90**, 1 (1929). — Wood, J. E., and E. F. Williams: J. of Biol. Chem. **177**, 53 (1949).

Dr. Rudolph Keller, East 74th Street, New York 21, N. Y.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 512—517 (1953).

Aus dem May-Institute for Med. Research of the Jewish Hospital, Cincinnati, Ohio, U.S.A.

Hautveränderungen und Krampfverhütung unter D_2-Hypervitaminose bei jungen Albinoratten*.

Von

ALFRED FROEHLICH †.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 27. Februar 1953.)

Im Jahre 1942 veröffentlichte ich mit Dr. I. ARTHUR MIRSKY, zu dieser Zeit Direktor des May-Institutes für medizinische Forschung in Cincinnati, Ohio, USA, 2 Arbeiten, die die Empfindlichkeit für Krämpfe im Verhältnis zum Alter behandelten (FROEHLICH and MIRSKY).

Es fand sich, daß Säurefuchsin Nr. 72, nach s. c. Injektion von 0,5 mg/g in 2%iger Lösung, an Albinoratten im Alter zwischen 7 und 18 Tagen als Krampfgift wirkte. Diese Krämpfe waren tonisch-klonisch und endeten meistens tödlich. Die Haut zeigte an der Stelle der Injektion eine rote Farbe, der Urin war ebenfalls rot. Ältere Ratten zeigten keine Empfindlichkeit für Krämpfe. Dies war nur dann der Fall, wenn das Säurefuchsin in das Gehirn der älteren Ratten injiziert oder, nach vorheriger s. c. Injektion von 0,12 mg/g Theophyllinum natrio-aceticum, s. c. verabreicht wurde. Wir kamen zu der Schlußfolgerung, daß die sogenannte „Blut-Gehirn-Schranke" bei jungen Ratten noch nicht vorhanden war, sondern erst nach dem 21. Lebenstag aktiv wurde.

A. FROEHLICH u. E. ZAK hatten in einer Reihe von Arbeiten gezeigt, daß die Permeabilität der Gewebe durch vorhergehende Theophyllin-Injektionen gesteigert wird. In einer weiteren Arbeit (A. FROEHLICH) wurde von mir darauf hingewiesen, daß durch orale Vorbehandlung von jungen Ratten mit großen Dosen von Vitamin D_2 (Viosterol) die normale krampferzeugende Wirkung von Säurefuchsin verhindert wird, bei vorheriger Gabe von Theophyllin jedoch eintritt.

Zweifellos wird durch die experimentelle D_2-Hypervitaminose eine Verdichtung der Gewebe, in erster Linie der sogenannten „Blut-Gehirn-Schranke", hervorgerufen, die zu einer verringerten Gewebsdurchlässigkeit führt. Daß diese Erschwerung der Permeabilität sich auch auf andere Organe erstreckt, geht aus dem Zurückbleiben des Wachstums der behandelten Ratten hervor.

In Experimenten, die in den Jahren 1942 und 1943 an jungen Ratten durchgeführt wurden, war das Ziel, die Säurefuchsinkrämpfe durch Verringerung der Permeabilität mit Hilfe großer, peroral gegebener Dosen von Vitamin D_2 zu verhüten. Die Wirksamkeit der D_2-Hypervitaminose

* Beitrag zur Feier des 80. Geburtstages von Professor Dr. OTTO LOEWI, New York-City, U.S.A.

zeigte sich auch im Zurückbleiben des Wuchses und des Gewichtes im Vergleich mit unbehandelten Tieren des gleichen Wurfes.

Als Präparat wurde Viosterol, eine käufliche Form bestrahlten Ergosterols in öliger Lösung verwendet (1 cm^3 enthält 400000 I E.). Dieses Präparat wurde mittels einer Mikropipette in das Maul des Versuchstieres gebracht. Mit den meisten Experimenten wurde begonnen, wenn die Ratten 4 oder 5 Tage alt waren. Die tägliche Dosis schwankte zwischen 500 und 1500 I E. Diese Gaben wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt, nach einer Pause von 1—2 Tagen folgte dann eine neue Serie von 3—5 Tagen. Höhere Dosen als 2000 I E. oder darüber wurden nicht vertragen, es trat der Tod ein. Dies war auch der Fall bei sehr jungen Ratten nach wiederholten Dosen von 1500 I E.

Experimenteller Teil.

A. Versuche mit Theophyllin.

1. Das folgende Experiment war eines von mehreren Dutzenden: Am 6. bis 9. Lebenstag erhielten 3 Albinoratten (* 26. 5. 1942) je 1000 I E. Viosterol, nach einer eintägigen Pause am 11. Tag wiederum 1000 I E., wobei sich Glatzköpfigkeit entwickelte. Am 12. und 13. Tag erhielten sie je 1500 I E. und zeigten sich am folgenden, dem eigentlichen Versuchstag, in gutem Zustand. 2½ Std nach einer s. c. Injektion von 0,5 mg/g Säurefuchsin Nr. 72 in 2%iger Lösung hatte ein Tier Krämpfe von kurzer Dauer. Nach 5 Std waren sämtliche Tiere wiederum normal. Demgegenüber bekam eine 15 Tage alte Kontrollratte vom selben Wurf nach s. c. Injektion derselben Menge Säurefuchsin Nr. 72 nach 1½ Std starke Krämpfe, unter denen sie 6 Std später starb.

In keinem Fall, bei dem die D_2-Hypervitaminose nicht tödlich war, konnten durch Säurefuchsin Krämpfe erzeugt werden, im Gegensatz zu den gleichaltrigen Kontrollratten. Daraus kann geschlossen werden, daß die sogenannte „Blut-Gehirn-Schranke" normalerweise bei sehr jungen Ratten fehlt und in diesen Versuchen unter dem Einfluß verhältnismäßig großer Dosen von Vitamin D_2 geformt wurde. Daß als Ursache dieses Verhaltens ein Schutz gegen die Säurefuchsinvergiftung angesehen werden kann, wurde aus den Versuchen klarer, in denen der s.c. Säurefuchsininjektion eine Theophyllininjektion vorausgegangen war, wie das folgende Experiment zeigt:

2. Drei Albinoratten (* 14. Sept. 1942) bekamen je 8 Viosterol-Dosen von je 1000 I E. zwischen dem 4. und 12. Lebenstag, zusammen also 8000 I E. pro Tier. Zwischen dem 9. und 10. Tage entwickelte sich Glatzköpfigkeit. Am 13. Tag bekam jedes der durchaus gesund aussehenden Tiere um 9.30 Uhr 0,12 mg/g Theophyllinum natrio-aceticum und nach ½ Std folgte eine s. c. Injektion von Säurefuchsin Nr. 72 (2%ige Lösung, 0,5 mg/g). Alle drei Ratten entleerten roten Urin und starben nach 2½ Std unter vollen Krämpfen. Somit zeigte Theophyllin die Fähigkeit, die Krampfwirkung des Säurefuchsins auszulösen, obgleich die Tiere durch die Vitamin D_2-Vorbehandlung geschützt waren.

3. Nach Froehlich u. Mirsky ist die Möglichkeit, bei jungen Ratten durch Galleinjektionen Krämpfe zu erzielen, auf die ersten 9 Lebenstage beschränkt. Es ist daher nicht möglich, durch Vitamin D_2-Vorbehandlung in diesem Lebensalter einen Schutz gegen Gallekrämpfe zu

erzielen. Dies ist aber leicht möglich gegen die Säurefuchsin-Krämpfe im Alter von 16 Tagen. Die Möglichkeit, unter gewissen Umständen durch die Vorbehandlung mit Vitamin D_2 doch einen Schutz gegen die Gallekrämpfe zu erreichen, wurde im Jahre 1942 durch einige Experimente bewiesen. Benützt wurde Galle von der Firma Parke-Davis & Co. Den Typus der Krämpfe beschrieben wir als rhythmisch-klonisch; vorher trat Reflextätigkeit, Zappeln, lautes Quieken, dann Lethargie auf. Die meisten Versuchstiere überlebten.

Zwei Albinoratten, 9 Tage alt, 8 und 7,8 g, wurden peroral mit je 7500 I E. Viosterol, beginnend vom 3. Lebenstage, vorbehandelt. Am 9. Lebenstage erhielten sie 0,3 mg/g Galle von Parke-Davis & Co. in 1%iger Salzlösung intraperitoneal, ohne daß sie innerhalb der folgenden 7 Std irgendwelche Symptome aufwiesen. Am nächsten Morgen wurden beide Tiere tot aufgefunden. Eine Kontrollratte aus demselben Wurf (15,5 g) erhielt am 9. Lebenstage dieselbe Menge Galle und bekam stark erhöhte Reflextätigkeit und strychninartige Krämpfe. Am nächsten Tag war sie wieder normal.

B. Veränderungen in der Haut von jungen Albinoratten bei D_2-Hypervitaminose.

In früheren Veröffentlichungen haben verschiedene Autoren über schwere Veränderungen in vielen Organen berichtet. In diesen Publikationen wurde auf die Veränderungen der Haut im allgemeinen kein Gewicht gelegt. Die allgemeine Ansicht ist die, daß die Verkalkung die *primäre* Erscheinung ist, die Degeneration des Gewebes die *sekundäre*. Sweeny & Smith und Chown machten auf Veränderungen der Haut und der Haare aufmerksam. Die ersteren machten die Feststellung, daß nach Verfütterung großer Gaben von Viosterol an erwachsenen Ratten (200 bis 300 g) nach 10 Tagen die Haare grob werden, ausfallen, so daß die Haut sichtbar wird. Die Tiere wurden ruhe- und appetitlos und verloren nach 50 Tagen die Hälfte ihres Körpergewichtes. Sobald die Gaben eingestellt wurden, erholten sich die Tiere, aber die Arteriosklerose blieb bestehen. Chown u. a. haben bemerkt, daß unter dem Einfluß großer Mengen von Vitamin D bei jungen Ratten Verkalkungen der Haut mit Glatzenbildung, hauptsächlich auf dem Scheitel und am Hinterkopf entstehen. Mikroskopische Untersuchungen wurden nicht angestellt.

Im Jahre 1942—1943 begann ich mit einer Reihe genauer Untersuchungen der Hautveränderungen unter dem Einfluß von Vitamin D. In allen diesen Versuchen kam es zu einer Verzögerung des Wachstums. Am 15. Lebenstag z. B. betrug das Körpergewicht 9,1 g gegenüber 21 g bei unbehandelten Tieren des gleichen Wurfes. Der Effekt der Vitamin D-Vergiftung an Haut und Haaren zeigte sich zuerst in der Glatzenbildung am Scheitel und am Hinterkopf. Das Haar wurde immer spärlicher, bis zur vollkommenen Glatzenbildung. Dasselbe war auch gelegentlich an anderen Körperstellen der Fall, und zwar hauptsächlich am Rücken und am Thorax. Die Haut an diesen Stellen wurde „sklerodermisch“ und hart. Überdies wurden in den spärlich gewordenen Haaren „Schuppen“ sichtbar. Schließlich bedeckten sich die haarlosen Stellen auf dem Scheitel mit einer gleichmäßigen Lage einer weißen Substanz, welche

nach einiger Zeit leicht entfernt werden konnte oder von selbst abfiel. Diese Gebilde wurden „Schädelkappen" genannt.

Die chemische Untersuchung durch Dr. S. Rapport vom Forschungslaboratorium des Kinderspitals in Cincinnati, dem ich an dieser Stelle herzlichst danke, ergab folgende Resultate:

Gewicht der Hautprobe	81,7 mg
Gewichtsverlust nach 18 Std. Trocknen bei 110°	7,2 mg
Wassergehalt	8,8%
Aschegewicht	18,3 mg = 21,5%
Alkalität der Asche	0,214 m. äqu.
Phosphorgehalt	3,33 mg = 18,2%
Ca-Gehalt	7,0 mg = 38,2%
Berechnet für $Ca_3(PO_4)_2$: P	20,0%
Ca	38,7% = 2,36 m. äqu.

Die mikrokopisch-histologische Untersuchung der Hautprobe aus den Gebieten der Glatzköpfigkeit wurde von Dr. Philip Wassermann, Vorstand des klinischen Laboratoriums des Jewish-Hospitals, Cincinnati, dem ich an dieser Stelle herzlich danke, durchgeführt, und zwar an einer Albinoratte, welche vom 3. Lebenstage an mehr als 20000 I E Viosterol per os bekommen hatte und, am 10. Tage getötet, ein Gewicht von 6,9 g und beginnende Kahlköpfigkeit aufwies. Die Schnitte der Kopfhaut der Ratte zeigten ein dem Kontrolltier gegenüber einigermaßen verdicktes Epithel, eine leicht gestörte Anordnung der Zellen mit stellenweiser Atrophie und leichte Hyperkeratosis; die darunterliegende Cutis war gegenüber dem Kontrolltier einigermaßen zellreicher, ohne bedeutende Infiltration mit Wanderzellen. Schnitte vom Kinn zeigten Stellen von anscheinend nicht entzündeter Nekrose in der Cutis. An der 10 Tage alten Kontrollratte zeigten die analogen Stellen der Kopfhaut ein dünnes, aber intaktes Epithel, leichte Hyperkeratosis, eine dünne Cutis, keine Infiltration mit Wanderzellen, viele normale Haarfollikel. Die Photographie (Abb. 1) einer solchen abgestoßenen Schädelkappe (angefertigt von Dr. Wassermann) beweist, daß es sich hierbei um zusammenhängende Neubildungen handeln muß.

Abb. 1. „Schädelkappe" einer Albinoratte bei D_2-Hypervitaminose.

In einem anderen Experiment bekam eine Albinoratte zwischen dem 3. und 14. Lebenstage insgesamt 11000 I E. Viosterol. Befund: Das Präparat besteht aus zwei Teilen, und zwar Haut vom Kopf und vom Nacken. Der eine Teil ist mit pigmentierter Haut bedeckt, der andere ist weiß. Mikroskopisch: Hyperkeratosis, Atrophie, hauptsächlich in der Cutis, degenerative Veränderungen mit Calciumablagerungen, hauptsächlich in den mittleren Anteilen der Cutis.

Es war natürlich anzunehmen, daß die geschilderten Veränderungen an der Haut nicht die einzigen Folgen der Verabreichung von großen Dosen Vitamin D_2 sein würden, darauf deutet auch das starke Zurückbleiben im Wachstum bei der D_2-Hypervitaminose hin. In der Tat berichten eine Reihe von Untersuchern über die Folgen an inneren Organen. Seit langer Zeit sind ja degenerative und sklerotische Veränderungen bei dieser Hypervitaminose bekannt, besonders an Arterien, Nieren, Magen und Lungen, aber auch sonstige allgemeinere Störungen (vgl. dazu Kreitmair und Moll; Kreitmair und Hintzelmann; Wenzel; Hückel und Wenzel; Dixon und Hoyle; Holtz und von Brand; Shol, Goldblatt und Brown; Varela u. a.; Vanderveer; Ham; Spies und Hanzel; Windorfer; Holtz; Handovsky; Jung; Silver-Steck und Reed; Bauer und Freiberg; Covey und Waitlock; Harnapp; Windorfer; Donald und Zack).

Zusammenfassung und Schlußfolgerungen.

1. Die bei D_2-Hypervitaminose erhaltenen Befunde, nämlich die krampfverhindernde Wirkung, die Veränderungen, die hauptsächlich den Schädel betreffen, wie Glatzköpfigkeit und die Bildung der sogenannten „Schädelkappen" und schließlich das Zurückbleiben im Wachstum, deuten in die Richtung einer verringerten Durchgängigkeit der Gewebe im allgemeinen. Die Wirkung des Theophyllins, die sich in einer Wiederherstellung der krampferzeugenden Wirkung von Säurefuchsin kundgibt, muß daher mit einer vermehrten Durchlässigkeit der Gewebe erklärt werden.

2. Das Auftreten von degenerativen Veränderungen in der Haut unter der Wirkung von großen, aber nicht tödlichen Mengen von Viosterol konnte durch mikroskopische Befunde dargetan werden. Die Bildung der „Schädelkappen" ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Ausscheidung von $Ca_3(PO_4)_2$ von der Oberfläche der zerstörten Haut zurückzuführen. Die Degeneration scheint das *Primäre*, die Verkalkung und Ausscheidung des Calciumphosphats durch die Kopfhaut das *Sekundäre* zu sein. In Fällen, in denen rechtzeitig mit der Zufuhr des Viosterols aufgehört wurde, konnten sich die Versuchstiere wieder vollkommen erholen.

Literatur.

Bauer, J., and B. H. Freiberg: J. Amer. Med. Assoc. **130**, 1208 (1946). — Chown, B. et al.: J. of Path. **49**, Nr. 2 (1939). — Covey, G., and H. H. Waitlock: Ann. Int. Med. **26**, 508 (1946). — Dixon, W. E., and Hoyle: Brit. Med. J. **2**, 832 (1928). — Froehlich, A.: J. Mount. Sinai Hosp. N. Y. **19**, 4 (1952). — Froehlich, A., and I. A. Mirsky: Arch. of Neur. **47**, 30 (1942) — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **50**, 25 (1942). — Froehlich, A., u. E. Zak: Klin. Wschr. **1**, 1055 (1922); **4**, 2305 (1925); **4**, 2303 (1925); **6**, 2288 (1927). — Wien. klin. Wschr. **39**, 193 (1926); **41**, 1545 (1928). — Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **121**, 108 (1927); **141**, 351

(1929); **143**, 310 (1929). — Ham, G. C.: Arch. of Path. **16**, 1 (1933). — Handovsky, H.: Proc. Pacific. Sci. Congr. Pac. Sci. Assoc. **6**, 543 (1943). — Harnapp, G. O.: Schweiz. med. Wschr. **80**, 765 (1950). — Holtz, F.: Dtsch. med. Wschr. **66**, 687 (1940). — Holtz, F., u. Th. v. Brand: Z. phys. Chem. **181**, 227 (1929). — Höckel, R., u. H. Wenzel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **141**, 292 (1929). — Jung, A.: Schweiz. med. Wschr. **73**, 17 (1943). — Kreitmair u. Hintzelmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **137**, 203 (1928). — Kreitmair, H., u. Moll: Münch. med. Wschr. **63**, 113 (1928). — McDonald, N., and M. M. Zack: Fed. Proc. **1952**. — Shol, A., H. Goldblatt and H. B. Brown: J. Clin. Invest. **8**, 505 (1929/30). — Silver-Steck, A., and C. Z. Reed: J. Labor. a. Clin. Med. **29**, 48 (1944). — Spies, T. D., and H. Hanzel: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **31**, 717 (1934). — Sweeny, M., and E. Smith: Amer. J. Physiol. **95**, 620 (1930). — Vanderveer, J. B.: Arch. of Path. **12**, 941 (1931). — Varela, B. et al.: Virchows Arch. **274**, 210 (1929/30). — Wenzel, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **137**, 215 (1928); **145**, 366 (1929). — Windorfer: Klin. Wschr. **17**, 228 (1938).

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 518—527 (1953).

From the Department of Pharmacology, University of Southern California, Los Angeles, and the Scripps Metabolic Clinic, La Jolla, California.

Nitrogen Sparing Effect of Carbohydrate Investigated by Feeding of C^{14} Labeled Glucose* **.

By

E. Geiger and Arne N. Wick.

(Eingegangen am 7. März 1953.)

It has been shown in earlier papers[15] that the N-sparing effect of a single dose of carbohydrate is related to the time that elapsed between the consumption of the protein and sugar moiety of the diet. As to the mechanism of this nitrogen sparing effect, it has been assumed that carbohydrates may provide precursors for the formation of some non-essential amino acids[9]. This assumption was based on the earlier finding that amino acids can be utilized optimally for protein synthesis only if all the necessary amino acids, the essentials as well as the non-essentials, are simultaneously available in the tissues[3]. In cases where the non-essentials are not present in optimal quantities, the formation of such amino acids from sugar precursors may improve the utilization of the dietary essential amino acids.

In order to test this hypothesis, we investigated in the following experiments, by feeding of C^{14} labeled sugar, whether the quantity of C^{14} incorporated into body-proteins is related to the time which elapsed between feeding of a mixture of essential amino acids and of sugar; i.e., whether different quantities of C^{14} are incorporated into non-essential amino acids when the sugar is fed together or apart from the essentials.

Methods.

Amino Acid Mixture. The amino acid mixture was similar to that described by Rose and collaborators[19], and had the following composition: Valine 1.1 g., Leucine 1.2 g., Isoleucine 0.75 g., Methionine (racemic) 1.0 g., Threonine 0.75 g., Phenylalanine (racemic) 1.05 g., Tryptophan 0.3 g., Lysine HCl 1.9 g., Histidine HCl, H_2O 0.9 g., Arginine NCL 0.4 g., Sodium bicarbonate 1.3 g. Before each experiment, an aliquot of the amino acid mixture was suspended in water and each rat was given by stomach tube 500 mgs. of the amino acids in 4 ml. of water.

Glucose Solution. The sugar moiety of the diet consisted of glucose, uniformly labeled with C^{14} and prepared by biosynthesis[16]. Each animal was given by stomach tube 2.8 ml. of an aqueous solution of 1 g. labeled sugar and 100 mgs. of $NH_4H_2PO_4$.

---

* Dedicated to Professor Otto Loewi on the occasion of the 80th birthday.

** Supported by a grant from the Williams-Waterman Fund of the Research Corporation.

The ammonium phosphate was added as a nitrogen source for the production of the non-essential amino acids.

Isolation of Tissue Proteins. Immediately after sacrificing the animal, the liver sample was ground in a mortar with 10% trichloracetic acid. The suspension was centrifuged and the precipitate collected and re-extracted six times with 5% trichloracetic acid (TCA), then three times with absolute alcohol in order to remove the excess TCA. The powdered material was heated with 2.2% hydrochloric acid for three hours in a boiling water bath in order to hydrolyze the polysaccharide in the sample. After cooling, the solution was neutralized with sodium hydroxide and solid TCA was added to make a final concentration of 10%. The suspension was centrifuged, and the insoluble material was re-extracted six times with 5% TCA and finally the excess TCA was removed with alcohol and ethyl ether. The samples prepared this way contained about 14.8% nitrogen calculated on ash free basis.

Table 1. *Distribution of C^{14} Expressed as Percent of Fed Counts.*

		Simultaneous Feeding		Divided Feeding
1. Expired CO_2		72.2		71.0
2. Protein (carcass)		1.3		1.2
3. Glycogen and H_2O solubles (carcass) by diff.		14.0		12.0
4. Defatted organs				
a) Liver	2.6)		4.3)	
b) Intestines	3.9)		2.6)	
c) Kidneys	0.2)	6.8	0.2)	7.1
d) Lungs	0.10)		0.1)	
e) Heart	0.03)		0.04)	
5. Crude Fat				
a) Carcass		2.6		2.7
b) Liver		0.1		0.2
c) Intestines		0.4		0.3
d) Kidneys		0.02		0.03
e) Lungs		0.03		0.05
6. Urine		2.0		1.3
		99.5		95.9

In the experiments reported in Table 1 the tissue samples, after removal from the animal, were sharp frozen in an ethanol dry ice mixture and dried by lyophilization. The ground dehydrated tissue was extracted with a 1—1 mixture of petroleum and ethyl ether. The protein fraction of the defatted material was obtained after refluxing with 2.2% HCl and treatment with TCA as described in the previous section.

Radioactivity Determinations. The C^{14} content of the samples was determined by direct counting at infinite thickness[5] in a gas flow counter. In a few experiments the material was first oxidized by wet combustion and the CO_2 collected as $BaCO_3$.

Amino Acid Determination. The amino acids of the pooled samples of the liver proteins were separated on a cation exchange column of Dowex 50. The amino acids were identified by their positions in the pattern of ninhydrin responses in the eluates. The specific activity was determined through the courtesy of Dr. Richard J. Winzler[17].

Protein Free Diet. The protein free diet used in these experiments had the following composition: Cornstarch 1.100 gm., Rufex 100 gm., USP salt mixture II 80 gm., Cod liver oil 65 gm., Wheat germ oil 65 gm., Lard 80 gm., Choline HCl 4.2 gm., Calcium pantothenate 0.08 gm., Inositol 0.5 gm., Nicotinic acid 0.1 gm., Thiamine 0.08 gm., Riboflavin 0.07 gm., Pyridoxine 0.03 gm., Amino benzoic acid 0.5 gm., Biotin 0.005 gm., Folic acid 0.005 gm., Vitamin B_{12} 10 μg., Crude liver extract 2 ml. This diet was fed, as indicated later, in order to eliminate the supply of dietary amino acids other than those given later by stomach tube.

Animals. Young adult and adult male rats of the Slonaker strain were used.

Experiments.

In a preliminary experiment 12 rats which had been on the protein depleted diet for 14 days were used. One group of the animals (6 rats) received the amino acid mixture and the mixture containing labeled sugar and the ammonium salt simultaneously, the other group (6 rats) was fed the sugar moiety four hours after feeding the mixture of essential amino acids. Eight hours after the amino acid feeding the rats were sacrificed for analyses. Table 1 shows the condensed results of a typical experiment. These data do not indicate any significant differences in C^{14} content of the protein in the two groups and, therefore, a further discussion of technical details of these experiments will be omitted. In these experiments, however, the uptake of labeled compounds was distributed through the whole body and, therefore, it seems plausible that possible differences in the uptake between the two groups may be so small that they are masked by the inherent errors of the experimental procedure.

We tried, therefore, to establish conditions under which the new formation of protein, and therefore the expected uptake of C^{14}, would be localized mainly in one organ. As such a condition, we chose the regeneration of the liver tissue after partial liver extirpation.

The partial hepatectomy[2] was performed so as to remove about 75% of the liver. The partially hepatectomized rats were kept for 48 hours after surgery on the protein free diet. This dietary regime does not interfere with liver regeneration. Gurd, Vars, and Ravdin[10] found, in fact that the restoration rate of liver protein is increased in protein depleted rats. Forty-eight hours after the partial hepatectomy the food was removed from the cages and four hours later the animals were used for the experiments. One group (simultaneous feeding) was administered the amino acid mixture and the labeled sugar-ammoniumsalt mixture. In the other group (on divided feeding) the sugar-ammonium mixture was fed four hours after administration of the essential amino acids mixture. The animals were sacrificed eight hours after the first stomach tubing and the liver was removed for analyses.

The results of these experiments are condensed in Table 2. These data indicate that in all three experiments the C^{14} uptake by the liver protein was higher when the essential amino acids and the sugar were fed simultaneously as compared with the animals which received first the essential amino acids and four hours later the glucose solution.

Table 2. *C^{14} Content of Liver Proteins in Rats which Received the Amino Acid and Sugar Moiety of the Diet Simultaneously and Separately (Aminoacids first).*

Exp. No.	Rat No.	Weight of Rat-Gms.	Specific Activity Cts/mg protein A Divided Feeding	B Simultaneous Feeding
I	1	189	672	
	2	185	589	
	3	194		768
	4	193		794
	Ave.		631	781
II	1	106	356	
	2	120	394	
	3	107		966
	4	106		1006
	Ave.		375	986
III	1	248	2688	
	2	222	2982	
	3	232	2156	
	4	228	2553	
	5	232		4652
	6	231		4256
	7	237		3449
	8	224		4310
	Ave.		2595 ± 147*	4167 ± 218*

* Standard deviation of the mean. $p^{**} = 0.001$

** Probability by "t-value" method.

Statistical analysis of the data shows that the differences are highly significant.

In a second group of experiments (Exp. IV of Table 3), we reversed the order of the divided feeding; i.e., we fed first the sugar mixture and four hours later the essential amino acid mixture. The animals were sacrificed nine hours after feeding the sugar moiety. The data on these experiments show that in contrast to Experiments I—III of Table 2/ and Experiments IV of Table 3 the C^{14} uptake on divided and simultaneous feeding was practically equal. We repeated, therefore, in two further experiments (Nos. V and VI of Table 3), the simultaneous and the two types of divided feeding, using three groups of rats in each experiment.

Group A received the sugar and the amino acids simultaneously.

Group B received first the sugar mixture and four hours later the amino acids.

Group C received first the amino acid mixture and four hours later the sugar mixture.

Table 3. *C^{14} Content of Liver Proteins in Rats which Received Amino Acids and Sugars. Simultaneously or the Sugar 4 Hours before or 4 Hours after the Amino Acid Feeding.*

Exp. No.		Rat No.	Weight of Rat-Gms.	Specific Activity Cts/Pl. A Divided Feeding	B Simultaneous Feeding
IV		1	288		2766
		2	265		2635
		3	250		2811
		4	263		2502
		5	253	3064 Sugar 1st	
		6	270	2496 Sugar 1st	
		7	263	2695 Sugar 1st	
		8	287	2643 Sugar 1st	
		Ave.		2725	2680
V	Group A	1	275		717
		2	256		806
		3	250		697
		4	227		819
	Group B	5	268	729 Sugar 1st	
		6	262	672 Sugar 1st	
		7	252	672 Sugar 1st	
		8	234	634 Sugar 1st	
		Ave.		677 ± 19	760 ± 31
	Group C	9	267	595 Amino acid 1st	
		10	265	512 Amino acid 1st	
		11	253	582 Amino acid 1st	
		12	249	627 Amino acid 1st	
					1 P* <0.1
		Ave.		579 ± 26	760 ± 31
VI	Group A	1			4660
		2			5710
		3			4725
		4			5530
	Group B	5		4740 Sugar 1st	
		6		4750 Sugar 1st	
		7		4580 Sugar 1st	
		8		4930 Sugar 1st	
		Ave.		4807	5156 ± 271
	Group C	9		3910 Amino acid 1st	
		10		3233 Amino acid 1st	
		11		3468 Amino acid 1st	
		12		4230 Amino acid 1st	
		Ave.		3791 ± 226	5156 ± 271
					P* <0.01

P* Probability for Groups A and C calculated by "t-value" method.

All animals were sacrificed nine hours after the first feeding.

Both experiments show, in confirmation of the above discussed results, that the C^{14} uptake of the liver protein was practically equal for Groups A and B; i.e., for the groups which received the sugar mixture either simultaneously or four hours before the amino acid feeding. When, however, the sugar was fed four hours after the amino acid feeding, the uptake of C^{14} was significantly decreased. The possible reasons for these differences in C^{14} uptake will be discussed later.

Table 4. *C^{14} Content of Liver Proteins in Rats which Received only Sugar, or Sugar and Amino Acids Simultaneously.*

Exp. No.	Group	Rat No.	Feeding	Specific Activity Cts/Pl.
VII		1	Amino acid and Sugar	429
		2	mixture fed Simultan.	474
	A	3	Rats sacrificed 4 hours	445
		4	later	461
		Ave.		452 ± 10*
		5	Sugar mixture fed only.	558
		6	Rats sacrificed 4 hours	459
	B	7	later	538
		8		470
		9		685
		Ave.		542 ± 41* P* <0.2
VIII		1	Amino acid and sugar	635
		2	mixture fed simultan-	703
	A	3	eously. Rats sacrificed	595
		4	4 hours later	400
		5		355
		Ave.		538 ± 57*
		6	Sugar mixture fed only.	694
		7	Rats sacrificed 4 hours	771
	B	8	later	655
		9		717
		10		787
		Ave.		725 ± 26* P** <0.02
		11	Amino acid and Sugar	780
		12	fed simultaneously.	808
	C	13	Rats sacrificed 9 hours	796
		14	later.	830
		15		891
		Ave.		821 ± 19* P*** 0.01

* Standard deviation of the mean.

P* Probability by the FISCHER t-value method for difference between average result of Group A and B (Exp. VII.).

P** For difference between Group A and B of Exp. VIII.

P*** For difference between Group A and C of Exp. VIII.

In further analysis of the just reported results we compared the C^{14} uptake by the liver protein in rats which received *labeled sugar only* and compared it with the uptake after simultaneous feeding of the amino acid and sugar mixture (Table 4, Exp. VII and Exp. VIII). The animals were sacrificed four hours after feeding. These experiments show that the liver protein contained more C^{14} when the rats received *sugar only*. The difference in uptake for Experiment VIII was highly significant and for Experiment VII at least indicative.

This result is in best agreement with the findings of several authors, according to whom the uptake of labeled amino acids is increased when the animals are kept on protein free diet. According to our best knowledge, this phenomenon was first observed by White, Hoberman and Szego[24]. Similar results were reported by Lee and Williams[13], by Madden, Gidez, and Fancher[14], and by Solomon and Tarver[21].

The foregoing experiments indicated that labeled sugar has been used for production of amino acids which were then incorporated into the liver protein molecules. It seemed to be of importance, therefore, to determine which amino acids were formed from the carbon sources provided by the labeled sugar. We used for these experiments the pooled protein samples isolated from the livers of rats which received the essential amino acids and the labeled sugar simultaneously. The C^{14} of the amino acids isolated from the liver protein is shown in Table 5.

Table 5. *C^{14} in Amino Acids isolated from Liver Protein.*

Amino Acid	Specific Activity Cts. per min. per uM.
Arginine	187
Alanine	54
Glutamic Acid	40
Aspartic Acid	33
Glycine	20
Serine	19

According to this analysis, six amino acids contained C^{14} derived from the labeled sugar in detectable amounts. The highest was the incorporation into arginine; next came alanine, then glutamic acid, aspartic acid, glycine and serine in decreasing order. No uptake of C^{14} could be detected in threonine, proline, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, histidine or lysine. Therefore, the essential amino acids did not show any C^{14} uptake. This result is in good agreement with the experiments of Steele[23] on mice. We want to emphasize that histidine in contradistinction to arginine did not contain detectable amounts of C^{14}, thus supporting the finding of Rose, et al[18] that histidine is an essential amino acid to the rat. Tyrosine did not contain C^{14},

indicating that in the rat this amino acid is not formed from precursors other than phenylalanine. This is also in agreement with similar findings by STEELE[23] in mice and E. L. BLACK, KLEIBER, and SMITH[1] in cows.

The results of our experiments indicate also that the formation of non-essential amino acids from carbohydrate precursors is a rapid procedure because in most of our experiments only four hours elapsed between feeding of the labeled sugar and killing of the animals.

Discussion.

The results of our experiments with single feeding of C^{14} labeled glucose show that the regenerating liver protein contains labeled carbon. This indicates that glucose provides precursors for the synthesis of non-essential amino acids in the presence of available ammonia, as was first demonstrated in 1939 by FOSTER, et al[7] and since confirmed by SPRINSON, et al[22] and ROSE, et al[19]. Our results indicate further that one part of glucose is rapidly transformed to amino acids and incorporated into the protein of regenerating liver tissue. This finding could well support our hypothesis that glucose fed simultaneously with protein facilitates the utilization of essential amino acids by providing precursors for some missing non-essentials.

The experiments with simultaneous and divided feeding of essential amino acids and of labeled glucose, however, do not clarify the mechanism. Our experiments show that less labeled amino acids were incorporated when the labeled sugar solution (containing ammonium phosphate) was fed 4 hours after the amino acids were administered, as compared with the C^{14} uptake *after* simultaneous administration of the two diet fractions. This supports our contention that sugar improves the utilization of amino acids by providing precursors for such non-essentials which were not supplied in satisfactory quantity.

Complications arise, however, by further experiments which show that the C^{14} uptake was not decreased when sugar was fed not simultaneously but 4 hours *before* the administration of the amino acids mixture. For the explanation of this phenomenon we may assume that the non-essential amino acids are not metabolized or eliminated with the same speed as the essentials and therefore the amino acids formed from sugar may be available for supplementation of the essential amino acid mixture even 4 hours later. In this connection we would like to mention that some of our earlier, not yet published, experiments support this assumption. We found, in confirmation of ROSE, et al[19] and COX and MUELLER[4], that rats grow better when, besides the essentials, also the non-essential amino acids were included in the diet. We observed, however, that it is irrelevant whether the essentials were fed simultaneously with or 6 hours before the administration of the essentials. These experiments

therefore seem to suggest that non-essentials can be stored in contradistinction to the essentials, as shown by Geiger[8] and by P. R. Cannon[3].

Quite unexpected were finally the results of the experiments in which we did not feed any essential amino acids at all but only labeled sugar with ammonium phosphate. The C^{14} uptake in these experiments was very similar to the experiments in which essential amino acids and glucose were fed simultaneously. This seems to indicate that the *in vivo* incorporation of labeled sugar is quite independent from protein synthesis. This result is in best agreement with the findings of the earlier mentioned authors[13, 14, 21, 24]. The results of all these authors indicate that the incorporation of labeled amino acids is higher under conditions that favor protein catabolism rather than protein anabolism.

An analysis of our results is further complicated by the fact that evidently only one fraction of the labeled glucose is transformed into amino acids and therefore the presence or metabolism of non-transformed glucose may affect the incorporation of the newly formed amino acids. The data in the literature on the effect of glucose on amino acid incorporation are somewhat contradictory. For instance, Krahl[12] found that the presence of glucose enhances the uptake of labeled glycine by rat liver and diaphragm slices and Flock and collaborators[6] reported an increased amino acid uptake after glucose in hepatectomized animals. Sinex and collaborators[20], however, came to opposite conclusions. They found a decrease of incorporation of C^{14} alanine by the presence of glucose. Hoberman and Graff[11] reported further that glucose feeding markedly increase the retention of N^{15} from administered isotopic ammonium citrate. We intend therefore to investigate how glucose feeding influences the uptake of essential and non-essential amino acids by regenerating liver tissue.

On the basis of the reported results, we have to conclude that our experiments provide some circumstantial evidence but do not supply an unequivocal proof for the assumption that simultaneously fed glucose increases the retention of nitrogen by providing precursors for the formation of non-essential amino acids.

Summary.

1. Experiment with hepatectomized rats show that after single feeding with C^{14} labeled glucose and ammonium phosphate the regenerated liver protein contains labeled carbon.

2. When sugar is fed simultaneously with a mixture of essential amino acids the uptake of C^{14} is greater than the uptake on feeding labeled sugar 4 hours after administration of the essential amino acids.

3. When sugar was fed 4 hours before feeding the essential amino acid mixture the C^{14} uptake was similar to that observed on simultaneous feeding.

4. An analysis of the labeled protein shows that arginine contains the largest quantities of C^{14}. Alanine, glutamic acid, aspartic acid,

glycine and serine follow in order. No C^{11} could be discovered either in the other non-essential or in the essential amino acids.

Bibliography.

[1] Black, A. L., M. Kleiber and A. H. Smith: J. of Biol. Chem. **197**, 365, (1952). — [2] Brues, A. M., D. R. Drury and M. C. Brues: Arch. of Path. **22**, 658 (1936). — [3] Cannon, P. R.: Recent Advances in Nutrition: University of Kansas Press (1950). — [4] Cox, W. M., and A. J. Mueller: Fed. Proc. 8, 191 (1949). — [5] Drury, D. R., A. N. Wick, E. M. MacKay: Amer. J. Physiol. **163**, 655 (1950). — [6] Flock, E. V., M. A. Block, F. C. Mann, J. H. Grindlay, and J. L. Bollmann: J. of Biol. Chem. **198**, 427 (1952). — [7] Foster, G. L., R. Schoenheimer, D. Rittenberg: J. of Biol. Chem. **127**, 319 (1939). — [8] Geiger, E.: Science (Lancaster, Pa.) **111**, 594 (1950). — [9] Geiger, E.: Fed. Proc. **10**, 670 (1951). — Bancroft, R. W., E. Geiger and E. B. Hagerty: Endocrinology **49**, 149 (1951). — Geiger, E. R. W. Bancroft, E. B. Hagerty: J. Nutrit. **42**, 577 (1950). — Geiger, E., A. Wick, R. W. Bancroft: XVIII. Internat. Physiol. Congress. — [10] Gurd, F. N., H. M. Vars and J. S. Ravdin: Amer. J. Physiol. **152**, 11 (1948). — [11] Hoberman, H. D., and J. Graff: J. of Biol. Chem. **186**, 373 (1950). — [12] Krahl, M. E.: Science (Lancaster, Pa.), November 14, **1952**. — [13] Lee, N. D., and R. H. Williams: Fed. Proc. **11**, 420 (1952). — Madden, S. C., L. J. Gidez and J. A. Fancher: [14] Fed. Proc. **11**, 421 (1952). — [15] For earlier literature see Munro, H. N.: Physiologic. Rev. **31**, 4 (1951). — [16] Putnam, E. W., W. Z. Hassid, G. Krotvok and H. A. Barker: J. of Biol. Chem. **173**, 785 (1948). — [17] Rafelson, M., R. J. Winzler and H. E. Pearson: J. of Biol. Chem. **193**, 205 (1951). — [18] Rose, W. C., M. J. Oesterling and M. Womack: J. of Biol. Chem. **176**, 753 (1948). — [19] Rose, W. C., L. C. Smith, M. Womack and M. Shane: J. of Biol. Chem. **181**, 308 (1949). — [20] Sinex, F. M., J. MacMullen and A. B. Hastings: J. of Biol. Chem. **198**, 615 (1952). — [21] Solomon, G., and H. Tarver: J. of Biol. Chem. **195**, 451 (1952). — [22] Sprinson, D. B., and D. Rittenberg: J. of Biol. Chem. **180**, 707 (1949). — [32] Steele, R.: J. of Biol. Chem. **198**, 237 (1952). — [24] White, A., H. D. Hoberman and C. M. Szego: J. of Biol. Chem. **174**, 1049 (1948).

Prof. Dr. E. Geiger, 3842 Monteith Drive, Los Angeles 43, California.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219, S. 528—530 (1953).

Aus der medizinischen Klinik des New England Center Hospital und Tufts College Medical School, Boston, Massachusetts.

Über Harnlipase und ihre Beeinflussung durch Mecholyl und Secretin* **.

Von

MARTIN M. NOTHMAN.

(Eingegangen am 16. März 1953.)

Die Zahl der Arbeiten, die sich mit dem Vorkommen von fettspaltenden Fermenten im Harn befassen, ist außerordentlich gering. ZORN, der die titrimetrische Methode von WILLSTÄTTER für seine Untersuchungen benutzte, konnte im Urin gesunder Menschen keine Lipase finden. Ältere Angaben, die sich auf die Ergebnisse der Tropfmethode von RONA und MICHAELIS stützen, behaupten, daß fettspaltende Enzyme im Harn regelmäßig nachzuweisen sind. Doch sind gegen diese Methode mit Recht wichtige Einwände erhoben worden. Tierversuche sind noch spärlicher. Es liegen meines Wissens nach nur Angaben von HIRUMA aus dem Jahre 1923 vor, der im Kaninchenharn keine Lipase nachweisen konnte.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über das Auftreten von Pankreasenzymen in Blut und Urin unter normalen, pathologischen und experimentell geschaffenen Bedingungen beim Menschen und Tiere haben wir regelmäßig fettspaltende Fermente im Harn gesunder Individuen gefunden. Die Konzentration der Lipase bewegt sich zwischen 0,2 und 1,0 Einheiten. Sie stimmt damit ungefähr mit der Konzentration überein, die auch im Blutserum vorhanden ist. Darüber wird an anderer Stelle berichtet werden.

Zu den Tierversuchen benutzten wir Hunde. Auch bei ihnen konnten wir ein fettspaltendes Ferment im Harn regelmäßig nachweisen. Wir arbeiteten mit einer Methode, die wir im Serum bei unseren Experimenten über die Wirkung der Unterbindung der Pankreasgänge auf die Serumlipase verwendet haben. Nur geringe Modifikationen waren notwendig, um dieses Verfahren für Lipaseuntersuchungen im Harn brauchbar zu machen.

In 30 Bestimmungen der Harnlipase bei 8 verschiedenen Hunden fanden wir Werte, die zwischen 0,15 Einheiten und 1,2 Einheiten lagen. Die Schwankungsbreite ist ungefähr die gleiche wie im Serum von Hunden, wo der Lipasewert meistens nicht über 1,0 Einheit hinausgeht.

In einer früheren Arbeit haben wir nachgewiesen, daß die Serumlipase zu erheblichem Teile wenigstens pankreatischen Ursprungs ist.

* Herrn Professor Dr. OTTO LOEWI zum 80. Geburtstag gewidmet.

** Ausgeführt mit Unterstützung der American Cancer Society.

Es erschien uns daher von Interesse zu untersuchen, welchen Einfluß die gebräuchlichsten Stimulatoren der Pankreassekretion, das Mecholyl und das Secretin, auf die Ausscheidung der Lipase im Harn haben. Das Acetyl-beta-methylcholin hydrochlorid (Mecholyl) verursacht eine erhebliche Steigerung der Konzentration der Enzyme im Pankreassaft, ohne das Volumen des Pankreassaftes zu beeinflussen. Injektion von Secretin vermehrt das Volumen des produzierten Pankreassaftes beträchtlich, wobei die Konzentration der Enzyme meistens, wenn auch nicht erheblich absinkt. Beide Stoffe verursachen einen bedeutenden Anstieg der Gesamtmenge der im Pankreassafte vorhandenen Fermente (Comfort u. Osterberg, Lagerlöf).

Die Wirkung des Mecholyl und des Secretin auf die Konzentration der Lipase im Harn wurde an 5 Hunden in 22 Versuchen studiert. In 12 Experimenten wurde Mecholyl in Mengen von 3 mg bis 10 mg intramuskulär gegeben und in 10 Experimenten Secretin in Mengen von 20—30 Einheiten intravenös injiziert.

Die Lipaseausscheidung im Urin, die vor der Injektion 0,35, 0,45 und 0,65 Lipaseeinheiten per cc. betrug, stieg nach Mecholyl auf Werte an, die zwischen 2,0 und 6,4 Einheiten lagen. Der erste Urin, der fast regelmäßig wenige Minuten nach der Injektion — offenbar als Folge einer Allgemeinwirkung des Mecholyl — produziert wird, noch bevor eine Wirkung des Stoffes auf die Pankreassekretion erfolgt, zeigte die Vermehrung der Lipase noch nicht. Am stärksten war der Anstieg in der Urinportion, die 12—18 Std nach der Injektion gewonnen werden konnte. Nach 24 Std war der Effekt abgeklungen.

Die Wirkung des Secretin auf die Konzentration der Lipase im Harn zeigte sich in einem Anstieg der Werte von 0,65 und 0,75 Lipaseeinheiten per cc. vor Secretin, auf 4,05 Einheiten nach der Injektion. 12 Std später betrug die Konzentration der Lipase noch 3,4 Einheiten. Die Konzentration sank dann auf Werte, die zwischen 0,1 und 0,45 liegen, um nach einer zweiten Injektion wieder auf 4,9 anzusteigen. 24 Std nach der Injektion war die Konzentration noch immer 3,45 und sank später erst wieder ab auf Werte von 0,4 und 0,5.

Unsere Versuche zeigen, daß die Injektion von Mecholyl und Secretin beim Hunde zu einer stark vermehrten Konzentration von Lipase im Harn führt. Die nach Secretin erreichten Konzentrationen sind niedriger als die nach Mecholyl. Die Wirkung des Secretin ist aber offenbar länger anhaltend als der Effekt des Mecholyl. Die nach Mecholyl und Secretin ausgeschiedenen Urinmengen waren niemals geringer, oft beträchtlich größer als die in 24 Std gesammelten Harnmengen zu einer Zeit, wo die Hunde nicht im Versuch waren. Es handelt sich daher bei der Wirkung des Mecholyl und Secretin um eine gesteigerte Ausscheidung der Lipase und nicht nur um eine Ausscheidung der Lipase in

erhöhter Konzentration als Folge der Bildung eines stärker konzentrierten Urins. Da Mecholyl und Secretin die Menge der vom Pankreas in das Duodenum ausgeschiedenen Lipase vermehren, so ist anzunehmen, daß die im Urin gefundenen vermehrten Lipasemengen pankreatischen Ursprungs sind.

Zusammenfassung.

1. Der Harn gesunder Menschen enthält ein fettspaltendes Ferment.

2. Im Harn des Hundes ist regelmäßig ein fettspaltendes Ferment nachzuweisen.

3. Nach Injektion von Mecholyl und Secretin werden vom Hunde erheblich vermehrte Mengen von fettspaltendem Ferment ausgeschieden.

4. Die Wirkung des Secretin auf die Ausscheidung des fettspaltenden Fermentes ist länger anhaltend als die Auscheidung nach Mecholyl.

Literatur.

Comfort, M. W., and A. E. Osterberg: Arch. Int. Med. **66**, 688 (1940). — Hiruma, K.: Biochem. Z. **139**, 336 (1923). — Lagerlöf, H.: Quart. J. Med. 8, 115 (1939). — Nothman, M. M., T. Dennie Pratt and J. Benotti: J. Labor. a. Clin. Med. **33**, 833 (1948). — Zorn, B.: Fermentforschg **15**, 397 (1938).

Prof. Dr. Martin M. Nothman, 24 Colborne Road, Brighton 35, Massachusets, USA.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 219. S. 531—548 (1953).

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Vorstand: Prof. Dr. F. Eichholtz).

Papierchromatographische Trennung von Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat und anderen Phosphorverbindungen bei Säugetier- und Tauben-Erythrocyten verschiedenen K^+-Gehalts*.

(Studien über Blutgifte I.)

Von
A. Fleckenstein und E. Gerlach.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. März 1953.)

Die in Erythrocyten vorkommenden Phosphorverbindungen sind schon häufig Gegenstand analytischer Studien gewesen. Alle Untersucher (Kay; Engelhardt u. Ljubimowa; Morgulis u. Munsell; Barrenscheen u. Vásárhelyi; Kerr u. Daudd; H. v. Euler u. Brandt u. a.) sind sich dabei einig, daß die Konzentration der einzelnen P-Verbindungen bei den Erythrocyten der verschiedenen Tierarten stark variiert. Beträchtliche Unterschiede bestehen auch im Hinblick auf die osmotische Resistenz und die Permeabilität für Ionen (Mond u. Gertz) sowie hinsichtlich der Empfindlichkeit gegen glykolysehemmende (Wilbrandt) und methämoglobinbildende Gifte (vgl. Heubner, Bodansky). Ebenso auffällig sind die Differenzen im Kalium-Gehalt (Abderhalden, Kerr): Erythrocyten von Katze und Hund enthalten nicht mehr K^+ als im Serum vorhanden ist; in den Erythrocyten von Pferd, Kaninchen, Ratte, Meerschweinchen, Schwein und Mensch liegen dagegen ähnlich hohe intracelluläre K^+-Konzentrationen vor wie in Nerv und Muskel. Während diese kernlosen Säugetier-Erythrocyten ihren Energiebedarf hauptsächlich durch Glykolyse decken, sind die kernhaltigen Erythrocyten der Vögel auf aeroben Stoffwechsel eingestellt.

Zwischen den K^+-stapelnden Mechanismen der Zelle und dem P-Stoffwechsel werden heute enge Zusammenhänge angenommen. Die Frage liegt daher nahe, ob bei den verschiedenen Erythrocyten Parallelen zwischen dem Kalium- und Phosphorbestand auffindbar sind.

Die mikroanalytische Bestimmung der einzelnen P-Fraktionen in Gewebsextrakten ist bis heute mit erheblichen methodischen Schwierigkeiten verknüpft und führte nicht immer zu sicheren Aussagen. Aussichtsreichere Wege zur Trennung und Identifizierung von P-Verbindungen haben sich erst kürzlich durch Einführung papierchromatographischer

* Herrn Professor Dr. O. Loewi zum 80. Geburtstag gewidmet.

Verfahren ergeben (Hanes u. Isherwood*, Eggleston u. Hems). Durch die Arbeit von Eggleston u. Hems (unter Krebs) ist vor allem die direkte Bestimmung der phosphorylierten Adenosin-Verbindungen in kleinsten Mengen möglich geworden. Die im folgenden wiedergegebenen Untersuchungen sollten — unter Anpassung dieses papierchromatographischen Verfahrens an die Erfordernisse der ATP- und ADP-Bestimmungen in Gewebsextrakten — klären,

a) welche Mengen an Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Adenylsäure (AMP) und sonstigen organischen P-Verbindungen sowie an anorganischem Phosphat in den verschiedenen Erythrocyten-Arten vorhanden sind,

b) ob sich vielleicht Parallelen zwischen den Gesamt-P-Beständen der verschiedenen Tier-Erythrocyten oder dem Gehalt an bestimmten P-Fraktionen und den intracellulären Kaliumwerten auffinden lassen,

c) wieweit sich die Phosphat-Fraktionen der hauptsächlich glykolysierenden Säugetier-Erythrocyten von den Phosphat-Fraktionen der atmenden Vogel-Erythrocyten und anderer Gewebe mit aerobem Stoffwechsel unterscheiden.

Experimenteller Teil.

Methode.

1. Gewinnung der Erythrocyten-Extrakte.

Bei den Laboratoriumstieren wurden 3-5 cm³ Blut durch Herz-, Arterien- oder Venenpunktion (zum Teil in leichter Äthernarkose) gewonnen und jeweils in eine 3,5%ige Na-Citrat-Lösung im Mischungsverhältnis 5 Teile Blut / 1 Teil Citrat gegeben. Das Blut von Schwein, Rind und Pferd wurde aus dem Schlachthof bezogen und etwa 1 Std nach der Schlachtung verarbeitet. Die Abtrennung der Erythrocyten erfolgte durch 4 min Zentrifugieren. Anschließend wurde 3 mal mit Ca^{++}-freier Ringer-Lösung von 0° C gewaschen und jeweils 2 min abzentrifugiert.

Von der Erythrocytenmasse wurden 0,75 cm³ in einen auf —18° C gekühlten Mörser gegeben, und 2,5 cm³ 5%ige Trichloressigsäure von 0° C zur Hämolyse und Eiweißfällung zugesetzt. Diese Erythrocyten-Trichloressigsäure-Mischung wurde 4 min mit dem Pistiell zerrieben und dann 2 min scharf abzentrifugiert. Die überstehende klare Flüssigkeit (1,8—2,0 cm³ „Erythrocyten-Extrakt") kam sofort anschließend in eine Tiefkühltruhe und wurde dort in gefrorenem Zustand bei —18° C aufbewahrt. Die weitere Verarbeitung der Extrakte erfolgte stets innerhalb 2 bis 3 Std; denn bei tagelanger Aufbewahrung ist eine Abnahme von ATP zugunsten von ADP möglich.

Gegen das Waschen und Zentrifugieren der Erythrocyten sind von Kerr u. Daugd Bedenken erhoben worden; diese Autoren behandelten daher das Gesamtblut mit Trichloressigsäure und berechneten das Erythrocyten-Volumen aus dem Hämatokritwert. Auch Barrenscheen u. Vásárhelyi gingen vom Gesamtblut aus. H. v. Euler u. Brandt verwendeten dagegen gewaschene Erythrocyten. Wir übernahmen dieses Verfahren, da sich Trichloressigsäure-Extrakte aus Gesamtblut für unsere chromatographischen Zwecke als wenig geeignet erwiesen.

* Vgl. auch F. u. W. Turba: Naturwiss. **38**, 188/189 (1951).

2. Chromatographische Arbeitsweise.

Unsere Methode entsprach im wesentlichen dem von Eggleston u. Hems ausgearbeiteten Trennungsverfahren.

a) Vorbereitung des Papiers. Whatman No 1-Papier (Größe 19 × 45 cm) wurde zuerst 30 min in eine 0,5%ige, wäßrige Lösung von äthylendiamintetraessigsauerm Natrium (durch NaOH-Zusatz auf p_H 8,5 gebracht) eingelegt und dann 6 mal hintereinander je 10 min mit reichlich Aqua dest. gewaschen. Die Trocknung erfolgte mit Warmluft. Solche Papiere enthalten weniger Phosphat und störende Schwermetallionen als unbehandelte.

b) Auftropfen des Erythrocyten-Extraktes. An die Startlinie wurden übereinander jeweils 20 Tropfen zu 5 mm^3 (insgesamt 100 mm^3) gegeben. Jeder Tropfen wurde im kalten Luftstrom von 3 Föhnen (Distanz 25 cm) 2—3 min auf dem Papier getrocknet, ehe der nächste Tropfen an die gleiche Stelle gesetzt wurde. Zur Abmessung des Tropfens diente eine „Agla Micrometer Syringe" (Burroughs Wellcome & Co, Beckenham, Kent, England) mit einem garantierten Fehler von $\pm$ 0,05 mm^3 bei einer Menge von 10 mm^3. Die Erythrocyten-Extrakte wurden erst unmittelbar vor dem Aufziehen in die Spritze aufgetaut und dann in der Spritze in eisgekühltem Zustand gehalten.

c) Trennungsgang im I. Lösungsmittel. Zur Trennung der P-Verbindungen wurde im ersten Arbeitsgang Lösungsmittel I (90 Teile Iso-Propyläther + 60 Teile 85—90%ige Ameisensäure) 4—5 Std „aufsteigend" bei 18—20° C verwendet. Dabei bleiben ATP und ADP an der Startlinie zurück, während AMP sich nur wenig von der Startlinie entfernt. Anorganisches Phosphat wandert dagegen innerhalb 4—5 Std etwa 8—10 cm von der Startlinie fort. Zwischen Startlinie und anorganischem Phosphat kommen einige andere phosphorhaltige Fraktionen, des Erythrozyten-Extraktes zu liegen. Phosphat-Verbindungen, die sich nach Eggleston u. Hems zwischen Startlinie und organischem Phosphat lokalisieren,sind Glucose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat, Fructose-1-6-diphosphat, Phosphoglycerinsäure und Pyrophosphat. Nach v. Euler u. Brandt muß man in Erythrocyten mit dem Vorkommen von Hexosephosphorsäuren, Triosephosphorsäuren, Phosphobrenztraubensäure, Phosphoglycerinsäure, Diphosphoglycerinsäure, Glycerinphosphorsäure rechnen. Auch die P-Verbindungen zwischen Startlinie und anorganischem Phosphat lassen sich zum Teil gut voneinander abgrenzen, wenn durch längere Einwirkung des I. Lösungsmittels (z. B. 8 Std) die Distanz zwischen Startlinie und anorganischem Phosphat zunimmt.

d) Trennungsgang im II. Lösungsmittel. Nach gründlicher Trocknung der Papiere bei Zimmertemperatur wurde das II. Lösungsmittel (240 Teile n-Propylalkohol, 120 Teile Ammoniak (25%ig, spezifisches Gewicht 0,91), 40 Teile Aqua dest., enthaltend 0,8 cm^3 $^1/_{10}$ mol wäßrige Lösung von äthylendiamintetraessigsaurem Natrium) für 24 Std „absteigend" zur Anwendung gebracht. Die Temperatur wurde dabei durch eine elektrische Heizanlage mit Temperaturrelais genau auf 28° C einreguliert. Dieser Arbeitsgang diente der Trennung von ATP, ADP und AMP. AMP wandert im II. Lösungsmittel innerhalb 24 Std etwa 10 cm von der Startlinie weg; etwas langsamer bewegt sich ADP, noch langsamer ATP.

Im Gegensatz zu Eggleston u. Hems ließen wir bei der Trennung von ATP, ADP und AMP das II. Lösungsmittel in der entgegengesetzten Richtung wie das I. Lösungsmittel wandern.

In Abb. 1 und Abb. 2 ist unsere Methode schematisch dargestellt: Abb. 1 gibt das Papier vor der Anwendung des I. Lösungsmittels wieder; Abb. 2 zeigt das Eintauchen der Knickstelle ins I. Lösungsmittel. Anorganisches Phosphat wandert bei

dieser Anordnung von der Startlinie aufsteigend gegen das Ende *EF* des Papiers. Vor Anwendung des II. Lösungsmittels wird dann Teil *CDEF* des Papieres parallel zur Startlinie — und in etwa 4 cm Abstand davon — abgeschnitten. Anorganisches Phosphat und ein Teil der anderen P-Verbindungen, die im I. Lösungsmittel von der Startlinie weg gegen das Ende *EF* des Papieres laufen, werden auf diese Weise eliminiert. Das II. Lösungsmittel wird dann am Teil *ABCD* des Papieres so zur Anwendung gebracht, daß ATP, ADP und AMP von der Startlinie absteigend auf das Ende *AB* zuwandern. Diese — einer zweidimensionalen Arbeitsweise vergleichbare — Methode hat den bedeutenden Vorteil, daß sich ATP, ADP und AMP nach Anwendung des II. Lösungsmittels in einem Abschnitt des Papieres lokalisieren lassen, der während der Anwendung des I. Lösungsmittels noch nicht mit P-Verbindungen in Berührung gekommen ist.

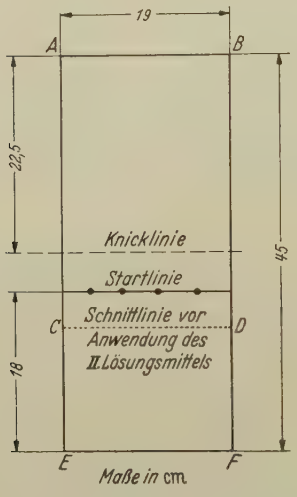


Abb. 1.

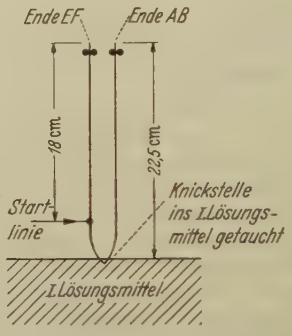


Abb. 2.

Abb. 1. Papier vor Anwendung des I. Lösungsmittels.

Abb. 2. Anwendung des I. Lösungsmittels. Die Knickstelle taucht ins Lösungsmittel ein. Nach der Einwirkung des I. Lösungsmittels wird Teil *CDEF* des Papiers abgeschnitten. Das II. Lösungsmittel kommt nur an Teil *ABCD* „absteigend" zur Anwendung.

e) Lokalisation von ATP, ADP *und* AMP *im* UV-*Licht.* Zur UV-Photographie der Adenin- (bzw. Inosin-) Verbindungen im Photoprintverfahren nach Markham u. Smith kam Licht der Wellenlänge 260 mμ zur Verwendung (Abstand der Lichtquelle vom Chromatogramm-Papier 1,25 m); das Licht wurde durch eine Quecksilber-Dampflampe (PL 334, Bestrahlungseinheit S 81 HP „Hanau") geliefert und durch Vorschaltung eines Kobaltsulfat-/Nickelsulfat-Filters (10,0 $CoSO_4 \cdot 7\ H_2O$ + 35,0 $NiSO_4 \cdot 7\ H_2O$ ad 100,0 H_2O) und eines Chlorgasfilters auf die gewünschte Wellenlänge gebracht. Für die Photographie wurde Agfa-Copex-Papier (21 × 29,7 cm) benutzt.

f) Entwicklung der P-*haltigen Flecke im Chromatogramm.* Zur Sichtbarmachung der P-haltigen Flecke wurden die Chromatogramme mit Molybdat-Reagens (25 cm³ 4%ige Ammoniummolybdatlösung, 5 cm³ 60%ige Perchlorsäure, 10 cm³ n-HCl, H_2O ad 100,0) besprayt und in feuchtem Zustand in einem Wärmeofen 7 min einer Temperatur von 85° C zur Spaltung der Ester ausgesetzt. Die P-haltigen Stellen im Papier erscheinen dann als tiefblaue Flecke, sobald die Chromatogramme — nach kurzer Behandlung mit Wasserdampf — in eine Schwefelwasserstoff-Atmo-

sphäre gebracht werden. Unmittelbar anschließend wurde die Identifizierung und Markierung der einzelnen P-Fraktionen unter Heranziehung der UV-Photographien vorgenommen. Bei längerem Warten können die blauen Flecke — besonders in feuchter Luft — abblassen oder durch Bläuung des ganzen Papieres undeutlich werden.

g) Quantitative Phosphorbestimmung. Die Veraschung der ausgeschnittenen P-haltigen Areale erfolgte in Pyrex-Reagensgläsern auf feuchtem Wege mit 0,5 cm^3 Veraschungsreagens (2 Teile 60%ige Perchlorsäure + 3 Teile konzentrierte 97- bis 99%ige Schwefelsäure). Der P-Gehalt wurde nach Berenblum u. Chain bestimmt. Hierbei fand das Elektrokolorimeter „Elko II" von Zeiß Opton mit Filter S 75 (Licht der Wellenlänge 750 $m\mu$) Verwendung. Von den — für die ausgeschnittenen Areale ermittelten — Phosphorwerten wurde der P-Gehalt des Papieres selbst jeweils abgezogen; dieser lag nach Durchlaufen des I. und II. Lösungsmittels im allgemeinen bei 0,01—0,03 γ P/cm^2 Papier.

Ergebnisse.

I. Die Phosphorverbindungen in den Erythrocyten des Menschen und verschiedener Säugetiere.

a) Befunde nach Anwendung des I. Lösungsmittels.

Schon die einfache UV-Photographie der Chromatogramme nach 4 Std Anwendung des I. Lösungsmittels (vgl. Abb. 3A und Abb. 4A) läßt erkennen, daß die Gesamtmenge der — an der Startlinie zurückbleibenden — UV-absorbierenden Adenosin-Verbindungen (ATP, ADP) von Tierart zu Tierart sehr verschieden ist. Während die Erythrocyten von Schwein, Mensch und Kaninchen eine große Menge UV-absorbierender Verbindungen enthalten, sind diese Fraktionen bei den anderen Säugetieren schwächer vertreten. Für das Vorkommen von Adenylsäure (AMP) haben sich keine Anhaltspunkte ergeben; bei Rinder-Erythrocyten erschien zwar nach Durchlaufen des I. Lösungsmittels in geringem Abstand von der Startlinie (vgl. Abb. 4A) eine UV-absorbierende Stelle; ihre Position stimmte jedoch mit der Lage bekannter AMP-Testflecke nicht ganz überein.

Entwickelt man die Chromatogramme nach Anwendung des I. Lösungsmittels, so kommt an der Startlinie und über der Startlinie ein intensiv blaues Feld voll organischer P-Verbindungen zum Vorschein (vgl. Abb. 5). Nur Rinder- und Katzen-Erythrocyten geben eine schwache Reaktion. Dieses Areal umfaßt den Phosphor von ATP, ADP sowie den Phosphor der übrigen organischen P-Verbindungen des Erythrocyten-Extraktes. *Nach Veraschung lieferte dieses Areal die in Tab. 1 zusammengestellten Werte für säurelöslichen organischen Gesamt*-P.

In erheblichem Abstand von der Startlinie stellt sich das anorganische Phosphat dar. Da in den Erythrocyten nur eine relativ geringe Menge von anorganischem P enthalten ist, erscheint diese Fraktion in den Chromatogrammen als zarter blauer Fleck. Auch Kreatinphosphat

würde als anorganisches Phosphat erfaßt werden, da in den Trichloressigsäure-Extrakten und in dem sauren Milieu des I. Lösungsmittels eine Hydrolyse dieses labilen Esters eintritt.

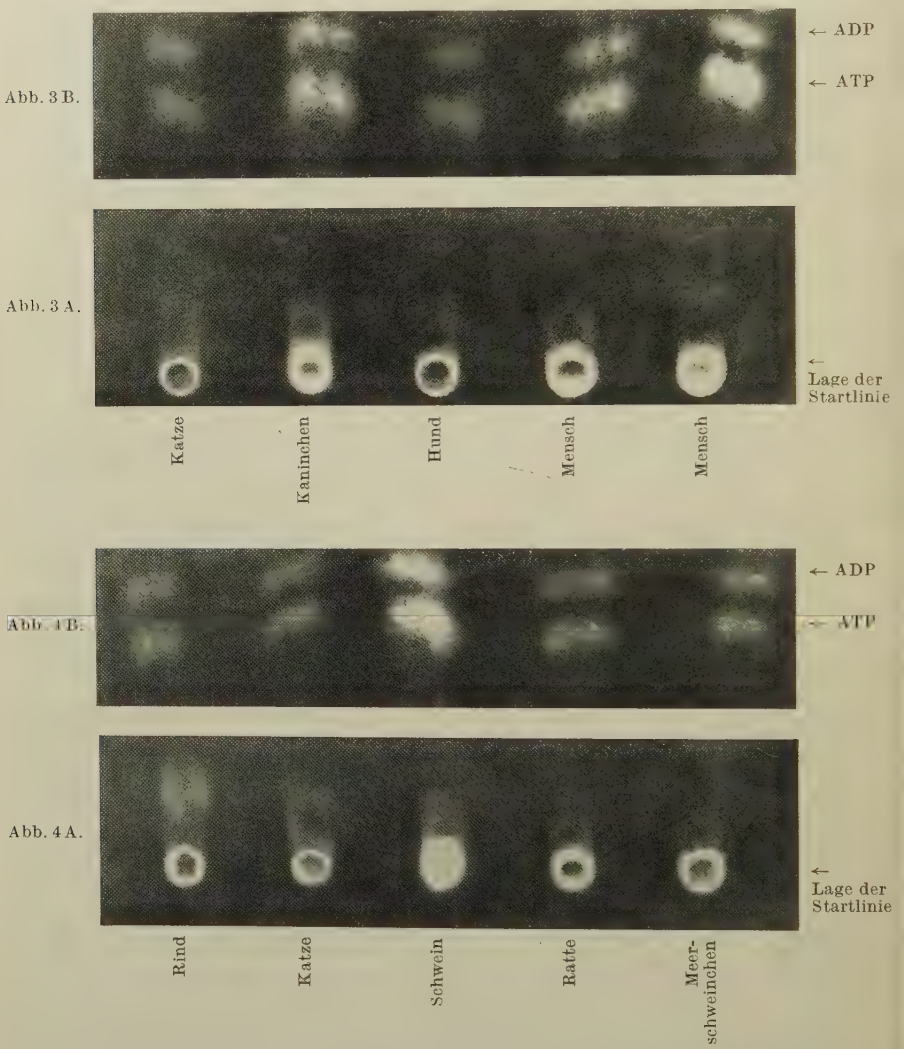


Abb. 3 und 4. UV-Photographie der Chromatogramme nach der Methode von Markham und Smith. Teil A gibt das Bild der Chromatogramme jeweils nach Anwendung des I. Lösungsmittels wieder. Die UV-absorbierenden Adenosin-Verbindungen ATP und ADP sitzen noch gemeinsam an der Startlinie. Die Erythrocyten-Extrakte von Schwein, Mensch und Kaninchen zeigen — entsprechend ihrem hohen Gehalt an ATP und ADP — besonders starke UV-Absorption. An der Startlinie wurden jeweils 100 m^3 (20×5 mm^2 übereinander) Erythrocyten-Extrakt aufgetragen. — Teil B gibt das Bild der Chromatogramme jeweils nach Anwendung des I. und II. Lösungsmittels wieder: ATP und ADP haben sich nun getrennt.

b) Befunde nach Anwendung des I. und II. Lösungsmittels.

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen liegt zweifellos in der Trennung von ATP *und* ADP*. Während nach Durchlaufen des I. Lösungsmittels ATP und ADP noch gemeinsam an der Startlinie sitzen, distanzieren sich diese beiden Verbindungen bei Einwirkung des II. Lösungsmittels. Die UV-Photographie (vgl. Abb. 3B und Abb. 4B) zeigt dann 2 getrennte absorbierende Flecke, die nach der Entwicklung der Chromatogramme eine Phosphatreaktion geben. Der ATP- und ADP-Gehalt läßt sich dann nach dem Ausschneiden und Veraschen dieser Areale unmittelbar aus dem P-Gehalt errechnen (vgl. Tab. 1).

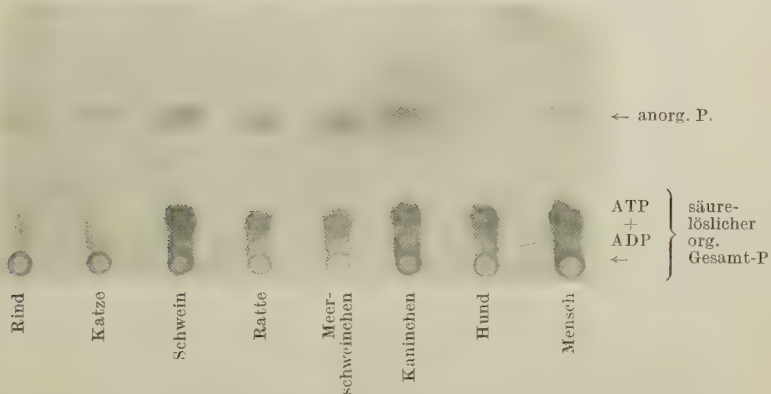


Abb. 5. Phosphor-Reaktion entwickelter Chromatogramme von verschiedenen Säugetier-Erythrocyten nach Anwendung des I. Lösungsmittels. An der Startlinie wurde jeweils 100 mm³ (20 × 5 mm³) Erythrocyten-Extrakt aufgetragen.

In Abb. 4B betrug z. B. die absolute Phosphormenge an der Stelle des dicken, UV-absorbierenden ATP-Fleckes aus Schweine-Erythrocyten 3,40 γ; an der Stelle des ADP-Fleckes wurde 1,12 γ P ermittelt. Dagegen enthielten die schwach UV-absorbierenden ATP- bzw. ADP-Flecke aus Rinder-Erythrocyten die absolute Menge von 0,24 γ ATP-Phosphor und 0,18 γ ADP-Phosphor.

Die Photographien zeigen — ebenso wie die Analysenergebnisse in Tab. 1 —, daß in allen Säugetier-Erythrocyten neben ATP eine zum Teil recht große Menge ADP vorhanden ist. Das Verhältnis ATP-Phosphor/ADP-Phosphor variierte dabei im allgemeinen zwischen 3:2 und 5:1. Berechnet man ATP und ADP in Mol, so zeigt sich, daß in einzelnen Fällen (z. B. beim Rind) sogar mehr ADP als ATP in den Erythrocyten vorhanden sein kann. Als höchsten Wert für ATP-Phosphor fanden wir

* Die Identifizierung von ATP und ADP in den Extrakten erfolgte durch den Vergleich mit bekannten ATP- und ADP-Testpräparaten. Der ADP-Fleck enthielt bei etwa gleicher Stärke der UV-Absorption stets etwa $^1/_3$ P weniger als der ATP-Fleck. In sämtlichen Handelspräparaten von „ATP", die uns zur Verfügung standen, waren auch erhebliche Mengen ADP (bis zu 50%) vorhanden.

Tabelle 1. *Verteilung des organischen und anorganischen Phosphors und Kalium-Gehalt von Säugetier-Erythrocyten.*
(Bezogen auf Kubikzentimeter Erythrocyten-Masse.)

Tierart	Säure-löslicher org. Gesamt-P	ATP	ADP	Org. Rest-P	Anorg. P	K^+
	γ P/cm³	γ P/cm³	γ P/cm³	γ P/cm³	γ P/cm³	μmol/cm³
Katzen	101,0	14,4	6,4	80,2	20,2	5,4
	108,0	—	7,2	—	20,2	
	86,0	20,3	5,5	60,2	10,3	5,9
	85,0	21,4	6,6	57,0	11,4	
	86,4	30,3	10,1	46,0	18,5	4,6
	87,0	28,6	10,9	47,5	18,5	
Hunde	422,0	43,0	16,3	362,7	17,3	5,6
	417,0	39,0	11,3	366,7	17,5	
	254,0	19,9	0,6	233,5	—	5,1
	253,0	20,3	0,7	232,0	—	
Rinder	47,2	8,8	6,1	32,3	21,7	33,8
	48,5	8,7	8,7	31,1	20,8	
	48,2	10,9	9,0	28,3	19,4	28,1
	51,8	10,5	9,2	32,1	21,2	
	33,5	6,3	4,8	22,4	11,7	33,8
	34,0	7,2	6,8	20,0	11,6	
	72,8	26,4	13,8	32,6	10,8	22,5
	70,5	26,9	12,5	31,1	8,4	
Pferd	358,0	5,1	1,6	351,3	4,0	88*
	358,0	5,2	1,5	351,3	6,8	
Kaninchen	574,6	59,5	31,0	483,5	12,4	99*
	568,0	49,0	25,6	493,4	9,9	
	502,0	70,5	19,9	411,6	3,7	
	502,0	70,7	19,9	411,4	2,7	
Ratten	379,0	47,7	19,9	311,4	11,1	100*
	372,0	43,6	17,3	311,1	13,5	
	333,0	37,9	10,0	285,1	26,2	
	339,0	39,5	8,9	290,6	25,7	
Meer-schweinchen	323,0	13,5	7,6	301,9	23,8	105*
	341,0	14,5	5,3	321,3	28,0	
	366,0	28,8	9,5	327,7	23,4	
	362,0	30,6	10,1	321,3	24,0	
Schweine	643,0	91,0	22,9	529,1	37,1	100*
	652,0	101,3	27,2	523,5	37,1	
	427,0	52,7	24,4	349,9	22,2	
	431,0	49,0	24,0	358,0	22,5	
	420,0	61,3	19,7	339,0	19,9	
	411,0	59.3	21,2	330,5	18,9	
	720,0	155,0	27,5	537,5	33,7	
	734,0	151,0	24,6	558,4	34,0	

Tabelle 1 *(Fortsetzung)*.

Tierart	Säure-löslicher org. Gesamt-P	ATP	ADP	Org. Rest-P	Anorg. P	K^+
	γ P/cm³	γ P/cm³	γ P/cm³	γ P/cm³	γ P/cm³	μmol/cm³
Menschen . . .	421,0	44,0	12,6	364,4	7,8	110*
	427,0	62,0	16,9	348,1	10,0	
	310,0	54,8	26,3	228,9	16,6	
	312,0	56,5	24,3	231,3	17,0	
	410,0	101,0	26,7	282,3	11,4	
	411,0	102,5	26,6	281,9	11,3	

Die Chromatogramme wurden immer im Duplikat angelegt. In der Tabelle sind jeweils beide Werte wiedergegeben. Die gute Übereinstimmung zeigt, daß der Fehler der Bestimmungsmethode außerordentlich gering ist im Vergleich zur individuellen Schwankungsbreite von Tier zu Tier.

Die mit * bezeichneten Werte für K^+ wurden einer Zusammenstellung von Kerr (J. biol. Chem. **117**, 227 [1937]) entnommen. Die K^+-Werte in den untersuchten Erythrocyten von Katze, Hund und Rind wurden jeweils in eigenen Versuchen flammenphotometrisch bestimmt. Kerr gibt den K^+-Gehalt bei der Katze mit 6 μmol/g, beim Hund mit 9 μmol/g, beim Rind mit 22 μmol/g an.

bei einem Schwein über 150 γ P/cm³ Erythrocyten. Dieser Wert erreicht fast den mittleren ATP-Gehalt eines Frosch-Rectus.

Auf den hohen Pyrophosphatgehalt der Schweine-Erythrocyten ist zuerst von Barrenscheen u. Vásárhelyi aufmerksam gemacht worden. Lohmann u. Schuster isolierten dann aus 30 l Schweineblut 2,1 g ATP als Bariumsalz. Auch menschliche Erythrocyten und Kaninchen-Erythrocyten sind zum Teil sehr reich an ATP; in einem Fall fanden wir in Menschen-Erythrocyten über 100 γ ATP-Phosphor/cm³ Erythrocyten-Masse.

Bei der bisher üblichen Methode nach Lohmann wurde die Menge des — in n-HCl während 7 min bei 100° C — leicht abspaltbaren P ermittelt („Pyrophosphat-P") und hieraus auf den „ATP-Gehalt" geschlossen. Dieser „Pyrophosphat-P" ist bekanntlich die Summe des aus ATP und ADP stammenden labilen Adenosin-P und läßt daher keine detaillierte Aussage über die tatsächliche Konzentration von ATP *neben* ADP zu. Alle in der Literatur vorliegenden Angaben über Erythrocyten-ATP wurden auf diesem indirekten Wege über Hydrolysenkurven gewonnen (Barrenscheen u. Vásárhelyi, Kerr u. Dauod, Rapoport u. Mitarb. u. a.). Es ist daher von besonderem Interesse, unsere direkt ermittelten Werte mit diesen älteren Ergebnissen zu vergleichen. In Tab. 2 sind die Werte für „Pyrophosphat-P" im Gesamtblut nach Barrenscheen u. Vásárhelyi und die Angaben von Kerr u. Dauod für das „Pyrophosphat-P" von Blutkörperchen neben unsere Werte gestellt. Die eigenen direkten Werte für „Pyrophosphat-P" wurden als die Summe von $^2/_3$ ATP-Phosphor + $^1/_2$ ADP-Phosphor aus Tab. 1 errechnet.

Es ergibt sich zunächst, daß – bei Anordnung der Erythrocyten nach steigendem Pyrophosphat-Gehalt — unsere eigene Reihenfolge mit der Reihe der genannten Autoren ziemlich gut übereinstimmt. Auch die anderen Untersucher fanden bei Pferd und Rind die niedersten, bei Kaninchen, Mensch und Schwein die höchsten Pyrophosphat-Werte.

Tabelle 2. *Werte für „Pyrophosphat-P" in Gesamt-Blut und Erythrocyten.* (Vergleich des nach Lohmann bestimmten „Pyrophosphat-P" mit den eigenen, direkt bestimmten Werten.)

Tierart	Pyrophosphat-P für Erythrocyten (Kerr u. Dauod) Mittelwerte γ P/cm³	Pyrophosphat-P für Gesamt-Blut (Barrenscheen u. Vasarhelyi) γ P/cm³	Pyrophosphat-P für Erythrocyten direkt ermittelt (eigene Versuche) γ P/cm³
Pferd	30	8,5—11,8	4,2—4,3
Rind	34	13,3 –15,9	6,6—24,5
Katze	64	—	12,8—25,3
Hund	71	27,7	13,6—36,9
Ratte	76	—	30,2—41,8
Meerschweinchen	91	49,8	9,8—25,5
Kaninchen	160	46,2—63,3	45,5—57,2
Mensch	121	41,4—74,1	35,6—81,6
Schwein	228	73,3—83,2	44,6—117,1

Nur Meerschweinchen-Erythrocyten ordnen sich in unserer Reihe etwas anders ein. Die absoluten Angaben für Pyrophosphat-P differieren dagegen stärker. Dies ist wohl nur zum Teil auf die verschiedene Methodik bei der Gewinnung der Erythrocyten-Extrakte (defibriniertes Blut bzw. Citrat-Blut; Enteiweißung des Gesamtblutes bzw. Verwendung gewaschener Blutkörperchen) zurückzuführen. Unsere Werte bewegen sich zwar in der gleichen Größenordnung wie die — nach der Hydrolyse-Methode gewonnenen — Resultate, liegen aber durchwegs niedriger.

Dieser Umstand kann nicht überraschen; denn schon H. v. Euler u. Brandt haben darauf aufmerksam gemacht, daß bei der Hydrolyse von Blutkörperchen-Hämolysaten (in n-HCl bei 100° C über 7 min) außer Pyrophosphat-P noch andere ziemlich leicht hydrolysierbare Phosphatester aufgespalten werden. Sie schreiben daher: „Da man (bei Erythrocyten) oft ATP auf diese Weise berechnet hat, sind die in der Literatur angegebenen Werte vermutlich zu hoch." Die übliche Methode der Bestimmung nach Lohmann ist offenbar bei Säugetier-Erythrocyten weniger zuverlässig als bei Muskelgewebe. H. v. Euler u. Brandt haben daher überhaupt auf zahlenmäßige Angaben des Pyrophosphat-P bei Erythrocyten verzichtet und lediglich die Hydrolysekurven mitgeteilt.

Wir glauben, daß unsere direkt ermittelten, niedrigeren Pyrophosphat-Werte den tatsächlichen Verhältnissen besser als die älteren Angaben entsprechen und geeignet sind, bestehende Zweifel zu beheben. Immerhin ist mit großen individuellen Schwankungen auch bei der

gleichen Tierart zu rechnen. Im Gegensatz dazu ist z. B. bei Froschmuskulatur der ATP- und ADP-Gehalt nach dem Ergebnis von 80 Analysen von Tier zu Tier erheblich konstanter.

Ein Parallelismus zwischen dem K^+*-Gehalt der verschiedenen Erythrocytenarten und dem Gehalt an* ATP, ADP *oder Pyrophosphat-*P *liegt offensichtlich nicht vor;* denn Pferd und Schwein, die im Pyrophosphat-P-Gehalt mindestens ums 10fache differieren, weisen ganz ähnliche K^+-Werte auf (vgl. Tab. 1). Andererseits enthalten Hunde-Erythrocyten etwa 10—15mal weniger K^+ als Pferde-Erythrocyten, aber trotzdem 3—8mal mehr Pyrophosphat-P.

Zieht man die Summe ATP-Phosphor + ADP-Phosphor von dem säurelöslichen „organischen Gesamt-P" ab, so erhält man einen Rest, der in Tab. 1 als „*organischer Rest*-P" bezeichnet ist.

Diese Fraktion „organischer Rest-P" umfaßt Glucose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat, Fructose-1-6-diphosphat usw. Ein großer Teil der Fraktion wird jedoch anscheinend durch eine Verbindung dargestellt, die — nach ihrer größeren Wanderungsgeschwindigkeit im I. Lösungsmittel zu urteilen — mit den angeführten Phosphatestern nicht identisch sein dürfte. Bei 2 Menschen wurden z. B. etwa 230 γ bzw. 280 γ P/cm³ Erythrocyten in der Fraktion „organischer Rest-P" gefunden; davon fielen 155 γ P/cm³ bzw. 206 γ P/cm³ auf diese nicht näher definierte Verbindung. Greenwald, Morgulis u. Munsel, Rapoport u. a. haben das Vorkommen beträchtlicher Mengen Diphosphoglycerinsäure in Säugetier-Erythrocyten (mit Ausnahme von Rinder-Erythrocyten) betont; bei Kaninchen, Mensch und Ratte soll z. B. über die Hälfte des organischen säurelöslichen P als Diphosphoglycerinsäure vorliegen. Diese Substanz stand uns jedoch bisher für chromatographische Vergleichsversuche nicht zur Verfügung; die Frage der Identität muß daher vorerst offenbleiben.

Die Analysenwerte von Tab. 1 erhärten den Eindruck, der schon aus der Inspektion der entwickelten Chromatogramme nach Anwendung des I. Lösungsmittels gewonnen werden konnte: Katzen- und Rinder-Erythrocyten sind besonders arm an organischen P-Verbindungen, während die Blutkörperchen von Hund, Pferd, Kaninchen, Ratte, Meerschweinchen, Schwein und Mensch erhebliche P-Mengen vor allem in Form von „organischem Rest-P" enthalten. Diese Fraktion überwiegt in den meisten Fällen über die anderen P-Verbindungen (ATP, ADP, anorganisches Phosphat) bei weitem und gibt den Chromatogrammen von Säugetier-Erythrocyten ein charakteristisches Bild. Ordnet man die verschiedenen Erythrocytenarten nach ihrem Gehalt an „organischem Rest-P", so ergibt sich die Reihe:

Rind $<$ Katze $<$ Hund, Pferd, Meerschweinchen, Ratte, Mensch $<$ Kaninchen $<$ Schwein.

Diese Anordnung stimmt im wesentlichen mit früheren Angaben von Kay überein; denn auch Kay ordnete die Säugetier-Erythrocyten nach zunehmendem organischen P wie folgt:

Rind < Katze < Hund, Pferd, Mensch < Meerschweinchen < Ratte < Kaninchen < Schwein.

Auch in diesen Reihen besteht kein Parallelismus zum Kalium-Gehalt.

II. Die organischen und anorganischen Phosphor-Fraktionen bei atmenden Vogel-Erythrocyten.

Es war von besonderem Interesse, auch kernhaltige, stark atmende Vogel-Erythrocyten in die Untersuchung einzubeziehen und die Zusammensetzung ihrer organischen P-Verbindungen mit dem P-Bestand der glykolysierenden Säugetier-Erythrocyten zu vergleichen. Abb. 6 gibt ein Chromatogramm von Tauben-Erythrocyten nach dem I. Lösungsmittel wieder: Schon die bloße Inspektion läßt erkennen, daß sich diese

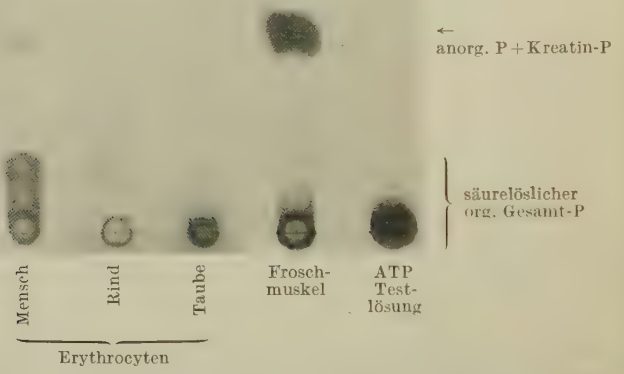


Abb. 6. Phosphor-Reaktion entwickelter Chromatogramme von Menschen-, Rinder- und Tauben-Erythrocyten verglichen mit einem Froschmuskel-Chromatogramm. Bild nach Anwendung des I. Lösungsmittels. Beim Froschmuskel fällt der starke Gehalt an anorganischem P + Kreatin-P auf. Der an der Startlinie zurückbleibende Phosphor von Tauben-Erythrocyten besteht aus ATP, ADP, Phytinsäure und Verbindung X. Der ATP-Testfleck zeigt, daß im sauren Milieu des I. Lösungsmittels keine Abspaltung von anorganischem P aus ATP erfolgt. An der Startlinie wurden 100 mm³ Erythrocyten-Extrakt von Mensch und Rind, 50 mm³ Erythrocyten-Extrakt von der Taube aufgetragen.

kernhaltigen Zellen außerordentlich stark von den kernlosen Säugetier-Erythrocyten unterscheiden; denn abgesehen von einer geringen Menge anorganischen Phosphats verbleibt bei den Tauben-Erythrocyten praktisch der ganze Phosphor während der Einwirkung des I. Lösungsmittels an der Startlinie. Gerade diejenigen P-Verbindungen, die sich bei den Säugetier-Erythrocyten in charakteristischer Weise als dicker blauer Fleck von der Startlinie wegbewegen, fehlen in den Tauben-Erythrocyten fast vollständig. Die Stelle, an der sich Glukose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat, Fructose-1-6-diphosphat lokalisieren, ist bei den Chromatogrammen von Tauben-Erythrocyten nahezu P-frei. Dieser Befund

deckt sich sehr gut mit den Angaben von ENGELHARDT sowie von H. v. EULER u. BRANDT. Auch diese Autoren konnten in Tauben-Erythrocyten — im Gegensatz zu den Säugetier-Erythrocyten — keine Ester vom Typ der Hexosephosphorsäuren (und der Phosphobrenztraubensäure) finden.

Um so überraschender ist der außerordentliche Reichtum der Tauben-Erythrocyten an ATP (vgl. Tab. 3). Mit etwa 230 γ P/cm³ in der ATP-Fraktion wurde der ATP-Gehalt der Tauben-Erythrocyten bisher von keinem anderen Gewebe, das wir daraufhin analysierten (Leber, Niere, Herz, Zwerchfell, Darmschleimhaut von Ratten sowie Froschmuskulatur) übertroffen. Der ADP-Phosphor in Tauben-Erythrocyten beträgt dagegen nur etwa ein Zehntel des ATP-Phosphors. Auf den hohen Pyrophosphat-Gehalt bzw. ATP-Gehalt der Tauben-Erythrocyten ist schon 1930 von ENGELHARDT aufmerksam gemacht worden.

Tabelle 3. *Verteilung des organischen und anorganischen Phosphors von Tauben-Erythrocyten.* (Bezogen auf Kubikzentimeter Erythrocytenmasse.)

Säurelöslicher org. Gesamt-P γ P/cm³	ATP γ P/cm³	ADP γ P/cm³	Phytinsäure γ P/cm³	Verbindung X γ P/cm³	Anorg. P γ P/cm³	K^+ mol/cm³
627	234	28,9	335	26,3	42,5	100*
637	230	29,2	339	27,0	39,4	
654	222	23,0	361	34,2	32,1	105*
635	223	22,4	355	37,7	32,0	

* Eigene flammenphotometrische Bestimmungen.

Der im I. Lösungsmittel an der Startlinie zurückbleibende P besteht nur zu etwa 35% aus ATP-Phosphor und 3—5% ADP-Phosphor; über die Hälfte (etwa 55%) entstammt dagegen einer nicht-UV-absorbierenden Verbindung, die in Säugetier-Erythrocyten nicht vorkommt. Diese Verbindung wandert erst im II. Lösungsmittel innerhalb 24 Std 2—4 cm von der Startlinie weg. Bei der Identifizierung dieser P-haltigen Substanz kam uns eine Angabe von RAPOPORT zu Hilfe, der über das Vorkommen von Inosit-hexaphosphorsäureester (Phytinsäure) in Hühner-Erythrocyten berichtete. Bis 50% des Gesamtbestandes an P in Hühner-Erythrocyten sollen nach RAPOPORT Phytinsäure sein. Bei der Prüfung des chromatographischen Verhaltens zeigten tatsächlich bekannte Proben von Phytinsäure im I. und II. Lösungsmittel mit der unbekannten Verbindung aus Tauben-Erythrocyten eine völlige Übereinstimmung. Weitere 5% des organischen Gesamt-P aus Tauben-Erythrocyten entfallen auf eine Substanz, über deren Identität uns noch keine Aussage möglich ist (Verbindung X, vgl. Tab. 3). ATP, ADP, Phytinsäure und Verbindung X machen zusammen 98—99% des organischen Gesamt-P aus, so daß andere Phosphatester nur in ganz geringer Menge vorhanden sein können.

Besprechung.

a) Zur Verteilung der Phosphor-Verbindungen in glykolysierenden und atmenden Erythrocyten.

Die vorliegenden Untersuchungen geben zunächst Einblicke in die sehr verschiedene Zusammensetzung der organischen P-Verbindungen in Säugetier- und Vogel-Erythrocyten: Bei den Säugetier-Erythrocyten stammt im allgemeinen nicht mehr als $^1/_5$ des organischen Gesamt-P aus der ATP- und ADP-Fraktion; nur bei den P-armen Katzen- und Rinder-Erythrocyten kann der Phosphor aus ATP und ADP unter Umständen über 50% des organischen Gesamt-P ausmachen. Bei den Tauben-Erythrocyten besteht dagegen etwa 95% des organischen P aus ATP und ADP sowie Phytinsäure. Diese charakteristischen Unterschiede zwischen den Säugetier- und Tauben-Erythrocyten sind in Abb. 7 graphisch dargestellt. Es ist hieraus zu ersehen, daß der starke ATP-Gehalt der Tauben-Erythrocyten in der gleichen Größenordnung bzw. noch etwas höher liegt als der ATP-Gehalt anderer Gewebe mit ausgesprochen aerobem Stoffwechsel, z. B. Froschmuskel. Offensichtlich ist es nicht ein höherer ATP-Gehalt, der das Muskelgewebe vor dem Tauben-Erythrocyten auszeichnet, sondern der Reichtum an Kreatinphosphat + anorganischem Phosphat. Diese Fraktion (Kreatin-P + anorganischer P) bewegt sich z. B. beim M. rectus vom Frosch (80 Bestimmungen) zwischen 12 μmol und 22 μmol P/g Muskel, während davon im Säugetier-* und Tauben-Erythrocyten nur 0,1—1,4 μmol P/cm^3 Erythrocyten vorhanden ist; Herz und Zwerchfell der Ratte zeigen ähnlich hohe Werte wie der Froschmuskel.

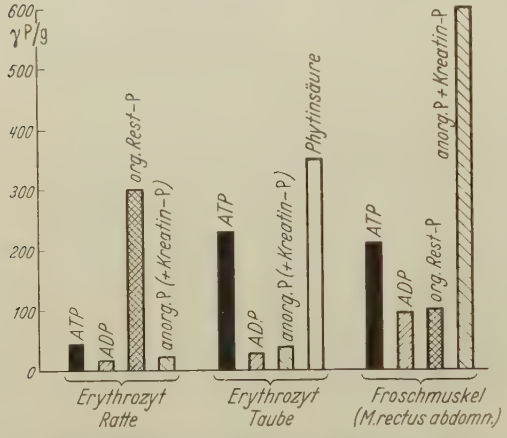


Abb. 7. Verteilung des organischen und anorganischen Phosphors in Säugetier-Erythrocyten (Ratte), Tauben-Erythrocyten und im Froschmuskel.

Der Reichtum der Säugetier-Erythrocyten an phosphorylierten Zwischenstufen des Kohlehydratabbaues hängt vermutlich mit ihrem glykolytischen Stoffwechsel zusammen. Bei den P-armen Rinder-Erythrocyten ist z. B. auch die Fähigkeit zu glykolysieren und in glucosefreiem Milieu anorganischen P abzugeben am wenigsten

* Nach Eggleton u. Eggleton (Brit. J. Physiol. 68, 193 (1929/30) ist im Blut (Hund, Katze, Kaninchen, Mensch) keine Spur von Kreatinphosphat nachweisbar, so daß die Fraktion [anorg. P + Kreatin-P] bei diesen Erythrocyten tatsächlich nur aus echtem anorganischem P bestehen dürfte.

ausgebildet; dagegen sind Kaninchen-Erythrocyten in dieser Hinsicht besonders aktiv (ENGELHARDT u. LJUBIMOWA). Schweine-Erythrocyten fallen aber aus der Reihe, da sie fast keine Glykolyse aufweisen. MORGULIS u. MUNSELL lehnten daher einen direkten Zusammenhang zwischen dem Gehalt an organischen P-Verbindungen und der Glykolyse-Intensität ab.

b) Zum Zusammenhang von P-Stoffwechsel und Kalium-Stapelung.

In Anbetracht der qualitativ und quantitativ verschiedenen Zusammensetzung der organischen P-Bestände in den Säugetier- und Vogel-Erythrocyten bzw. in den Muskelfasern ist es schwierig, irgendwelche Zusammenhänge zwischen dem Kalium- und Phosphat-Stoffwechsel aus unseren Befunden herauszulesen; denn Zellen von gleichem K^+-Gehalt können offensichtlich völlig verschiedene Phosphatester in verschiedensten Konzentrationen enthalten. Es trifft zwar zu, daß die K^+-reichen Säugetier-Erythrocyten (Kaninchen, Schwein, Meerschweinchen, Ratte, Pferd, Mensch) hohe Gesamt-P-Werte aufweisen, während die K^+-armen Katzen-Erythrocyten wenig P enthalten. Schon bei Hund und Rind scheinen jedoch besondere Verhältnisse vorzuliegen; denn der Hunde-Erythrocyt besitzt trotz relativ hoher P-Bestände wenig K^+, der Rinder-Erythrocyt trotz geringer P-Bestände mehr K^+ als der Hunde-Erythrocyt.

Die hohen Unterschiede zwischen den extra- und intracellulären K^+- und Na^+-Konzentrationen werden heute meist als dynamisches Gleichgewicht angesehen, wobei ein dem Diffusionsgradienten entgegen arbeitender, K^+-stapelnder und Na^+-abschiebender Prozeß den spontanen Austritt von K^+ aus der Zelle und das Eindringen von Na^+ in die Zelle immer wieder unter Energieaufwand ausgleicht.

Säugetier-Erythrocyten sind für Kationen auffällig wenig permeabel (MOND' HÖBER) und können daher den intracellulären K^+-Gehalt wahrscheinlich ohne besonders intensive Stoffwechselleistung aufrecht erhalten. Bei menschlichen Erythrocyten muß z. B. nur etwa 1,6—2,0% des Zellkaliums in 1 Std durch K^+-Aufnahme von außen wieder ersetzt werden, um den K^+-Bestand zu erhalten (RAKER' TAYLOR, WELLER u. HASTINGS; SHEPPARD u. MARTIN). Dagegen tauscht sich nach Befunden von KREBS, EGGLESTON u. TERNER das Kalium von Hirngewebe 120mal und das Kalium der Retina etwa 250mal schneller als das menschliche Erythrocyten-Kalium aus. Bis 10% des Retina-Kaliums muß pro Minute durch K^+-Rückbindung erneuert werden. Nach Ergebnissen von HAHN, HEVESY u. REBBE bei Kaninchen wird radioaktives K^{42} auch von der Muskulatur viel rascher als von den Erythrocyten aufgenommen. Immerhin sinkt auch bei Erythrocyten der K^+-Gehalt deutlich ab, wenn die energieliefernden Prozesse durch Einwirkung von Stoffwechselgiften ungenügend werden.

Von WILBRANDT, DANOWSKI, HARRIS, DAVSON u. a. wurde über eine K^+-Verarmung der Erythrocyten von Menschen bzw. Kaninchen nach Vergiftung der Glykolyse durch NaF oder Monojodacetat berichtet. Eine ähnliche K^+-Abnahme ist bei Verlangsamung des Stoffwechsels in Kälte (2—5° C über 5 Tage) zu beobachten (HARRIS). Bei Rückkehr auf eine Temperatur von 25—37° C wird dann K^+ von den Erythrocyten — unter Intensivierung des glykolytischen Stoffwechsels

(Maizels) — wieder aufgenommen. Küsel u. Netter fanden, daß das Erythrocyten-Kalium auch bei Einwirkung von Resorcin zu Verlust geht; nach dem Auswaschen von Resorcin und in Anwesenheit von Glukose bzw. Milchsäure und Phosphat kehrt dann K^+ bei 37° C wieder in die Erythrocyten zurück.

Die Vermutung liegt nahe, daß die Verschiedenheiten im K^+-Gehalt der Säugetier-Erythrocyten mit Unterschieden in der Intensität der restitutiven, an der K^+-Stapelung und Na^+-Abschiebung beteiligten Prozesse in Zusammenhang zu bringen sind. Es ist jedoch auch an Unterschiede der Membrandurchlässigkeit der Erythrocyten für K^+ und Na^+ zu denken. Zweifellos sind die Verhältnisse sehr kompliziert und es erscheint fraglich, ob überhaupt ein einheitlicher Mechanismus der K^+-Stapelung bei den verschiedenen Zelltypen (Erythrocyten, Nerven- und Muskelfasern, Hirn- und Retinagewebe) angenommen werden kann.

Ähnlich wie die K^+-Aufnahme scheint auch die Aufnahme von Phosphat — beurteilt nach der starken Temperaturabhängigkeit dieser Reaktion — an enzymatische Prozesse geknüpft zu sein (Halpern; Gourley u. Gemill). Hahn u. Hevesy fanden z. B., daß bei 37° C 14mal mehr $P^{32}O_4$ von Kaninchen-Erythrocyten gebunden wird als bei 0° C. Zu ähnlichen Befunden kamen Taylor, Levenson u. Adams. NaF und Monojodacetat hemmen nicht nur die K^+-Stapelung, sondern auch die Aufnahme von $P^{32}O_4$ um 75—80% (Gourley). Diese Parallelen zwischen K^+- und PO_4-Aufnahme geben aber noch keinen Hinweis, ob die K^+-Stapelung unmittelbar oder nur mittelbar mit den Phosphorylierungsprozessen zusammenhängt. Die bestehenden Diskrepanzen zwischen dem K^+- und P-Gehalt der verschiedenen Säugetier-Erythrocyten scheinen mehr für eine lockere Koppelung zu sprechen. Befunde von Küsel legen einen solchen Schluß ebenfalls nahe; denn Glucose kann das Abwandern von K^+ aus Menschen-Erythrocyten verhindern, obgleich es dabei zu einer Abgabe von anorganischem P aus den Erythrocyten kommt. K^+ und PO_4 scheinen unter diesen Bedingungen sogar im Gegensinne zu wandern. Einblicke in die Wechselbeziehungen zwischen K^+- und P-Stoffwechsel sind wohl am besten unter systematischer Verwendung von Giften zu gewinnen, die diese Prozesse unterbrechen. Eine gleichzeitige Analyse der Kalium-Bewegungen und der Effekte auf den P-Stoffwechsel ist dabei nötig. Die papierchromatographische Arbeitsweise eröffnet auf diesem Gebiet aussichtsreiche Möglichkeiten. Hierüber wird in folgenden Mitteilungen berichtet werden.

Zusammenfassung.

1. Unter Verwendung der papierchromatographischen Trennungsmethode von Eggleston u. Hems für organische Phosphorsäureester ist es möglich, in Trichloressigsäure-Extrakten aus Erythrocyten Adenosintriphosphat (ATP) *neben* Adenosindiphosphat (ADP) direkt zu bestim-

men. Dies war mit der bisher gebräuchlichen Hydrolyse-Methode von LOHMANN für Pyrophosphat-P nicht erreichbar.

2. Sowohl die Werte für säurelöslichen organischen Gesamt-P als auch die Werte für ATP und ADP differieren in den Erythrocyten der verschiedenen Tierarten sehr beträchtlich. Der Gehalt an direkt bestimmtem Pyrophosphat-P nimmt in der folgenden Reihe zu: Pferd < Rind < Katze, Meerschweinchen < Hund < Ratte < Kaninchen < Mensch < Schwein. Diese Ordnung stimmt mit älteren — durch die Hydrolyse-Methode gewonnenen — Ergebnissen von BARRENSCHEEN u. VÁSÁRHELYI sowie KERR u. DAUOD gut überein.

3. In den hauptsächlich glykolysierenden Säugetier-Erythrocyten liegt gewöhnlich nicht mehr als $^1/_5$ des säurelöslichen organischen Gesamt-P in Form von ATP und ADP vor. Für das Vorkommen von AMP (Adenylsäure) haben sich keine Anhaltspunkte ergeben. Rinder- und Katzen-Erythrocyten weisen die niedersten Werte, Schweine-Erythrocyten die höchsten Werte für säurelöslichen organischen Gesamt-P auf. Anorganischer Phosphor ist in allen Erythrocyten nur in relativ geringer Menge vorhanden.

4. Die Verteilung des organischen Phosphors in den atmenden Tauben-Erythrocyten ist völlig anders als in Säugetier-Erythrocyten: Etwa 38—40% des säurelöslichen organischen P ist in Form von ATP und ADP enthalten. Der ATP-Gehalt der Tauben-Erythrocyten entspricht dem ATP-Gehalt der Froschmuskulatur. Annähernd 55% entfallen — in Übereinstimmung mit Angaben von RAPOPORT — auf den Inosit-hexaphosphorsäureester (Phytinsäure). Hexosemonophosphorsäuren und Hexosediphosphorsäure waren in Tauben-Erythrocyten nicht nachweisbar.

5. Ein Parallelismus zwischen dem Kalium-Gehalt und den Gesamt-P-Beständen bzw. dem Gehalt an bestimmten P-Fraktionen der verschiedenen Tier-Erythrocyten liegt offensichtlich nicht vor. Dies spricht nicht für eine unmittelbare Koppelung von K^+-Stapelung und Phosphorylierung.

6. Die beschriebene papierchromatographische Arbeitsweise bietet neue und aussichtsreiche Möglichkeiten, auch die organischen Phosphorsäureester in pharmakologische Studien über Blutgifte einzubeziehen.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Heidelberger Akademie der Wissenschaften durchgeführt.

Die methodischen Anregungen zu der vorliegenden Arbeit ergaben sich aus papierchromatographischen Untersuchungen über den Phosphatstoffwechsel in Froschmuskeln, die der eine von uns (FL.) durch liebenswürdige Einladung von Herrn Prof. Dr. H. A. KREBS (British Medical Research Council, Unit for Research in Cell Metabolism, University of Sheffield) in dessen Institut durchführen durfte; ihm gilt unser besonderer Dank!

Literatur.

Abderhalden, E.: Z. physiol. Chem. **25**, 67 (1898). — Barrenscheen, H. K., u. B. Vásárhelyi: Biochem. Z. **230**, 330 (1931). — Berenblum, I., u. E. Chain: Biochemic. J. **32**, 295 (1938). — Bodansky, O.: Pharmacol. Rev. **3**, 144 (1951). — Danowski, T. S.: J. of Biol. Chem. **139**, 693 (1941). — Davson, H.: J. Cellul. Comp. Physiol. **18**, 173 (1941). — Eggleston, L. V., u. R. Hems: Biochemic. J. **52**, 156 (1952). — Engelhardt, W. A.: Biochem. Z. **227**, 16 (1930); **251**, 343 (1932). — Engelhardt, W. A., u. M. Ljubimowa: Biochem. Z. **227**, 6 (1930). — v. Euler, H., u. K. M. Brandt: Z. physiol. Chem. **240**, 215 (1936). — Gourley, D. R. H.: Amer. J. Physiol. **164**, 213 (1950). — Gourley, D. R., H. and C. L. Gemill: J. Cellul. Comp. Physiol. **35**, 341 (1950). — Greenwald, I.: J. of Biol. Chem. **63**, 339 (1925). — Hahn, L., u. G. Hevesy: Acta physiol. Scand. **3**, 193 (1942). — Hahn, L., G. Hevesy and O. Rebbe: Nature (Lond.) **1939 I**, 1021. — Halpern, L.: J. of Biol. Chem. **114**, 747 (1936). — Hanes, C. S., and F. A. Isherwood: Nature (Lond.) **164**, 1107 (1949). — Harris, J. E.: J. of Biol. Chem. **141**, 579 (1941). — Heubner, W.: Erg. Physiol. **43**, 9 (1940). — Höber, R.: J. Cellul. Comp. Physiol. **7**, 367 (1936). — Kay, H. D.: Brit. J. Physiol. **65**, 374 (1928). — Kerr, S. E.: J. of Biol. Chem. **117**, 227 (1937). — Kerr, S. E., and L. Dauod: J. of Biol. Chem. **109**, 301 (1935). — Krebs, H. A., L. V. Eggleston and C. Terner: Biochemic. J. **48**, 530 (1951). — Küsel, H.: Biochem. Z. **323**, 67 (1952). — Küsel, H., u. H. Netter: Zit. nach H. Netter, Biologische Physikochemie. Akad. Verlagsgesellschaft Athenaion Potsdam. — Lohmann, K., u. Ph. Schuster: Biochem. Z. **294**, 183 (1937). — Lohmann, K.: Biochem. Z. **202**, 466 (1928). — Maizels, M.: Brit. J. Physiol. **107**, 9 P (1948). — Markham, R., and J. D. Smith: Biochemic. J. **45**, 294 (1949). — Mond, R., u. H. Gertz: Pflügers Arch. **221**, 623 (1929). — Morgulis, S., u. J. D. Munsell: Biochem. Z. **278**, 89 (1935). — Raker, J. W., I. M. Taylor, J. M. Weller and A. B. Hastings: J. Gen. Physiol. **33**, 691 (1950). — Rapoport, S.: Biochem. Z. **289**, 411, 416 (1937). — Rapoport, S., and G. M. Guest: J. of Biol. Chem. **126**, 749 (1938); **131**, 675 (1939). — Rapoport, S.: J. of Biol. Chem. **135**, 403 (1940). — Sheppard, C. W., and W. R. Martin: J. Gen. Physiol. **33**, 703 (1950). — Taylor, F. H. L., S. M. Levenson and M. A. Adams: Blood **3**, 1472. — Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **243**, 519 (1940).

Doz. Dr. A. Fleckenstein,
Pharmakol. Inst. der Univ. Heidelberg, Hauptstr. 47—51.